

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEGRADACION ENZIMATICA DE LA BIOMASA DE

Onopordum nervosum Bois

Memoria presentada para optar al
Grado de Doctor por María José Negro
Alvarez

Directora: Dra.Carmen Martín Moreno

Ponente:Dr Angel Jimenez Solves

MADRID, 1991

A mis padres

Este trabajo de investigación se ha desarrollado en la División de Biomasa del Instituto de Energías Renovables del Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), con la ayuda de una Beca del Instituto de Estudios de la Energía.

Quiero expresar mi agradecimiento:

A la Dra Carmen Martín Moreno, directora de este trabajo, por su constante interés y apoyo prestado, y por sus orientaciones en la realización y redacción de esta memoria.

A la Dra. Rosa María Sáez Angulo, por haber contribuido a mi formación, no sólo científica sino humana, y que habiendo iniciado la dirección de este trabajo, por razones profesionales no pudo terminarlo.

Al Dr. Angel Jiménez Solves (Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia) por su amabilidad al aceptar actuar como ponente en esta Tesis, por la lectura y acertados comentarios del texto así como por el excelente trato que me ha dispensado.

Al Dr. Jesús Fernández González (Departamento de Botánica Agrícola, Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos) por el suministro del material vegetal con que se ha realizado este trabajo, y por sus orientaciones al comienzo del mismo.

Al Dr. Gonzalo Almendros (Instituto de Ciencias Medioambientales, CSIC) por su ayuda en el tratamiento estadístico de los resultados.

A mis compañeros de la División de Biomasa del IER por su entrega y amistad, especialmente a José María Martínez y Felicia Sáez por su colaboración en determinados experimentos.

Finalmente quiero dar las gracias a todas aquellas personas que sin su desinteresada ayuda, este trabajo no hubiese sido posible.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

AR	Azúcares Reductores
ATCC	American Type Culture Collection
CBH	Celobiohidrolasa
CC	<i>Conversión de celulosa en glucosa</i>
Cel.	Celobiosa
CMC	Carboximetilcelulosa
Cv	Coefficiente de variación
DNS	Acido 3,5-dinitrosalicílico
DOE	Department of Energy
DP	Grado de polimerización
E	Concentración de enzima
EG	Endoglucanasa
E/S	Relación enzima-sustrato
ES	Eficacia o eficiencia de sacarificación
GGH	Glucobhidrolasa
Glu	Glucosa
HEC	Hidroxietilcelulosa
MAE	Metilariléter
pNPG	<i>4-nitrofenolglucopiranósido</i>
PF	Papel de filtro
SCP	Single Cell Proteins, proteína de organismos unicelulares
Recup.	Recuperación
SERI	<i>Solar Energy Research Institute</i>
SFS	Sacarificación y fermentación simultánea
S/L	Relación sólido-líquido
UI	Unidades Internacionales
V _m	Valor medio

INDICE

1. INTRODUCCION

1.1. MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS	1
1.1.1. Fuentes de materiales lignocelulósicos	1
1.1.2. Composición y estructura de los materiales lignocelulósicos	7
1.1.2.1. Estructura de la celulosa, hemicelulosa y lignina	8
1.1.2.2. Organización de la pared celular	14
1.2. PROCESOS DE TRANSFORMACIÓN DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS	18
1.3. TRANSFORMACIÓN DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	22
1.3.1. Producción de celulasas	23
1.3.1.1. Características del complejo celulolítico	23
1.3.1.1.1. Composición	23
1.3.1.1.2. Modo de acción de celulasas	26
1.3.1.1.3. Sinergismo entre los componentes del complejo enzimático	27
1.3.1.1.4. Modelos cinéticos	29
1.3.1.2. Microorganismos productores de celulasas	30
1.3.1.2.1. Hongos celulolíticos	31
1.3.1.2.2. Bacterias	31
1.3.1.2.3. Mutantes	33
1.3.1.3. Inductores y sustratos	36
1.3.2. Pretratamientos de los materiales lignocelulósicos	38
1.3.2.1. Pretratamientos físicos	40
1.3.2.2. Pretratamientos químicos	41
1.3.2.3. Pretratamientos biológicos	42
1.3.3. Procesos de hidrólisis enzimática	42
1.3.3.1. Recuperación e inmovilización de enzimas	43
1.3.3.2. Separación de productos de hidrólisis	44
1.3.3.3. Procesos de sacarificación y fermentación simultánea y acoplada	45
1.3.3.4. Utilización de cocultivos	48

	<u>Página</u>
2. OBJETO E INTERES DEL TEMA	50
3. MATERIAL Y METODOS	51
3.1. PRODUCCION DE CELULASAS	51
3.1.1. Cepas productoras de celulasas	51
3.1.2. Cepa productora	51
3.1.3. Medios necesarios para el mantenimiento, caracterización, crecimiento y producción	51
3.1.3.1. Medios sólidos de crecimiento	51
3.1.3.2. Medios líquidos para la preparación del inóculo y para la producción en fermentador	52
3.1.3.3. Preparación del inóculo	52
3.1.4. Condiciones físico-químicas necesarias para la puesta en marcha de la producción en fermentador	52
3.2. ESTUDIO DEL COMPLEJO CELULOLITICO	52
3.2.1. Precipitación y concentración del complejo enzimático	52
3.2.2. Medida de la actividad enzimática	53
3.2.2.1. Determinación de la actividad sobre papel de filtro	53
3.2.2.2. Determinación de la actividad sobre CMC	56
3.2.2.3. Determinación de la actividad β -glucosidasa	58
3.2.3. Determinación de proteínas solubles	59
3.3. CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA Y DE LOS PRODUCTOS DE HIDROLISIS	59
3.3.1. Materia prima	59
3.3.2. Caracterización de la materia prima	61
3.3.2.1. Determinación de la humedad	61
3.3.2.2. Determinación de la solubilidad en NaOH 1%	61
3.3.2.3. Determinación de la solubilidad en agua (fría y caliente)	61
3.3.2.4. Extracto en éter	61
3.3.2.5. Extracto en alcohol-benceno	61
3.3.2.6. Análisis de componentes Hidrólisis total con ácido sulfúrico	61
3.3.2.6.1. Determinación de lignina (lignina Klason)	62
3.3.2.7. Determinación de cenizas	63
3.3.2.8. Determinación de nitrógeno total	63
3.4. PRETRATAMIENTOS	63

	<u>Página</u>
3.4.1. Molienda	63
3.4.2. Pretratamientos alcalinos	64
3.4.2.1. Pretratamiento con hidróxido sódico	64
3.4.2.2. Pretratamiento con hidróxido cálcico	64
3.4.3. Pretratamiento oxidante	64
3.4.3.1. Pretratamiento con peróxido de hidrógeno	64
3.4.3.2. Pretratamiento con hipoclorito sódico	64
3.4.4. Pretratamientos ácidos	64
3.4.4.1. Pretratamiento con ácido clorhídrico	64
3.4.4.2. Pretratamiento con ácido sulfúrico	65
3.4.4.3. Pretratamiento con ácido acético	65
3.4.5. Pretratamiento con solventes orgánicos	65
3.4.6. Pretratamiento de irradiación	66
3.4.7. Pretratamiento de explosión por vapor	67
3.4.8. Pretratamiento biológico	69
3.5. HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	70
3.5.1. Ensayos de hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada	70
4. RESULTADOS Y DISCUSION	71
4.1. Producción y caracterización de celulasas	71
4.1.1. Estudios de producción enzimática	71
4.1.2. Caracterización del complejo enzimático	79
4.1.2.1. Influencia del pH y la temperatura	79
4.1.2.2. Influencia de la concentración de sustrato y de enzima	83
4.1.2.3. Estabilidad del complejo enzimático	92
4.1.2.4. Estudios de inhibición por glucosa, celobiosa y etanol.	93
4.1.2.5. Estudios cinéticos de la β -glucosidasa del complejo enzimático	100
4.2. Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica de <i>O.nervosum</i>	104
4.2.1. Composición de la materia prima	107

	<u>Página</u>
4.2.2. Pretratamientos ensayados	107
4.2.2.1. Molienda	107
4.2.2.2. Pretratamientos alcalinos	107
4.2.2.2.1. Pretratamiento alcalino con hidróxido sódico	110
4.2.2.2.2. Pretratamiento alcalino con hidróxido cálcico	123
4.2.2.3. Pretratamientos oxidantes	125
4.2.2.3.1. Pretratamiento con peróxido de hidrógeno	125
4.2.2.3.2. Pretratamiento con hipoclorito sódico	128
4.2.2.4. Pretratamientos ácidos	133
4.2.2.4.1. Pretratamiento con ácido clorhídrico	134
4.2.2.4.2. Pretratamiento con ácido sulfúrico	134
4.2.2.4.3. Pretratamiento con ácido acético	134
4.2.2.5. Pretratamiento con radiación gamma	141
4.2.2.6. Pretratamientos con solventes orgánicos	156
4.2.2.6.1. Pretratamiento con etanol y butanol como organosolventes	157
4.2.2.6.2. Pretratamiento con n-butilamina	163
4.2.2.7. Pretratamiento de explosión por vapor	173
4.2.2.7.1. Pretratamiento de explosión por vapor en medio ácido	182
4.2.2.8. Pretratamiento biológico	188
4.2.2.9. Estudio comparativo de la eficacia de los distintos pretratamientos	206
4.3. Seguimiento del proceso de hidrólisis del <i>O. nervosum</i> pretratado	212
 5. CONCLUSIONES	 216
 6. BIBLIOGRAFIA	 219
 ANEXO I Medios de cultivo y reactivos	 233
ANEXO II Descripción de la planta piloto de pretratamiento	237
ANEXO III. Justificación estadística	239
ANEXO IV	
Índice de figuras	285
Índice de tablas	289

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION.

1.1. MATERIALES LIGNOCELULOSICOS.

1.1.1. Fuentes de materiales lignocelulósicos.

Desde hace varios años y como consecuencia de la crisis energética mundial, los científicos y los técnicos han fijado su atención en el potencial energético que ofrece la naturaleza en forma de biomasa. Teniendo en cuenta que el valor anual medio de la energía solar incidente en la tierra es de $3,67 \cdot 10^{21} \text{kJ.}$, y estimando una eficiencia del proceso de fotosíntesis del 0,07%, se ha cifrado en $1,8 \cdot 10^{11} \text{ t}$ la producción anual de biomasa primaria de la que el 40% es celulosa (Kosaric y col., 1983). Este compuesto, que constituye por tanto la fuente renovable de carbohidratos más abundante con la que cuenta el hombre, ha sido, durante los últimos años, y, sigue siendo objeto de numerosos estudios encaminados a la búsqueda de aquellos procesos más adecuados para su transformación. Estos estudios, cuya finalidad fundamental es la obtención de combustibles o de productos de interés como materias primas de las industrias química y agroalimentaria, han dado lugar a un notable desarrollo de investigación y tecnología en áreas diversas tales como la Biología, la Química o la Ingeniería de procesos.

La celulosa es un polímero de unidades de D-glucosa producido como consecuencia del proceso de fotosíntesis y que se deposita en las paredes celulares de todas las plantas superiores, en forma de fibras cristalinas que determinan la dirección del crecimiento celular y confieren la rigidez necesaria para el desarrollo de las plantas terrestres. Aunque la producción de celulosa no está confinada únicamente al reino vegetal, ya que algunos hongos, bacterias e incluso invertebrados marinos (tunicados) también producen celulosa, la fuente más importante de este polímero la constituyen las plantas superiores en las que este material es sintetizado continuamente mediante fotosíntesis.

Sin embargo, la celulosa no se encuentra pura sino asociada a una gran variedad de otros polisacáridos tales como almidón, pectina, distintas hemicelulosas (constituídas por polímeros o heteropolímeros de diversas pentosas, hexosas y sus ácidos urónicos) y lignina. Estos dos últimos, hemicelulosas y lignina son los polímeros que en mayor proporción acompañan a la celulosa en las estructuras vegetales. El algodón, por ejemplo, que es la forma de celulosa más pura que existe en la naturaleza, contiene hasta un 6% en peso de polisacáridos no celulósicos, proteínas y elementos minerales.

Dentro de las plantas superiores las fuentes de celulosa en orden decreciente de abundancia son los siguientes:

Tallos de angiospermas leñosas (maderas duras) con un contenido de 40-55% de celulosa, 24-40% de hemicelulosa y 18-25% de lignina (figura 1).

Tallos de gimnospermas leñosas (maderas blandas): 45-50% de celulosa, 25-35% de hemicelulosa y 25-35% de lignina (figura 1).

Tallos de monocotiledóneas (herbáceas tales como bambú, trigo, arroz, caña de azúcar), 25-40% de celulosa, 25-30% hemicelulosa y 10-30% de lignina.

Parénquima celular no lignificado de las hojas: 15-20% celulosa, 80-85% pectina y otras hemicelulosas.

Fibras parcialmente lignificadas o deslignificadas de algodón: 80-95% de celulosa, 5-20% hemicelulosa y poca lignina.

Del total de celulosa producida, la mayor proporción corresponde a las tres primeras fuentes, ésto es, la mayor parte de la celulosa se encuentra lignificada.

Con vistas a su posible utilización en procesos de transformación, la biomasa lignocelulósica se puede catalogar en tres grupos diferentes. En primer lugar, la biomasa natural producida espontáneamente en las zonas no cultivadas, tanto de tierra firme como en las zonas marítimas. Otro grupo lo constituye la biomasa residual procedente de las explotaciones agrícolas y forestales, así como la generada en las industrias y en los núcleos urbanos. Y por último, la biomasa producida especialmente para fines energéticos en las denominadas plantaciones de energía. De estas fuentes, las que tienen mayor interés por su abundancia y la naturaleza de su localización, ya que pueden obtenerse concentradas en áreas definidas, son los residuos agrícolas, residuos forestales, residuos de algunos tipos de industria, y los cultivos energéticos (Fernández, 1982).

La biomasa residual ofrece unas perspectivas universales de aprovechamiento ya que se produce en todo momento como consecuencia de la actividad humana y su eliminación constituye normalmente un problema. El reciclado y utilización de este tipo de biomasa en procesos de transformación supondría diversas ventajas. En primer lugar, se reduciría el deterioro ambiental que produce su acumulación o eliminación por vías convencionales, tales como la incineración de residuos en tierras de labor, haciendo posible al mismo tiempo, la recuperación de elementos minerales y materia orgánica que de otra forma se perderían total o parcialmente. Por otro lado, al ser una materia que se genera como subproducto de otras actividades, su coste de producción quedaría casi exclusivamente restringido a los gastos de recogida en aquellos casos en los que ésta no se realizara necesariamente.

Los residuos agrícolas generados en nuestro país son fundamentalmente de tres tipos: paja de cereales grano, residuos de cultivos industriales y restos de podas de frutales. En la tabla I se expone el rendimiento medio en residuos agrícolas de los cultivos más usuales en España, así como la producción total de los mismos (Martínez y Rodríguez, 1985). La composición química de los residuos agrícolas de carácter lignocelulósico ha sido estudiada por diversos autores. En la tabla II se expresa la composición media de algunos de ellos.

Tipo de cultivo	Rendimiento Producción 10 ³	
	medio t/ha.año	t/año
Trigo	1,71	5061,8
Cebada	2,27	6437,0
Avena	1,73	638,0
Centeno	2,34	254,6
Maiz	10,04	3995,8
Arroz	6,94	549,9
Sorgo	6,19	267,4
Cereales Grano	3,07	17204,5
Cítricos	2,00	456,4
F.pépita	3,50	428,6
F.hueso	2,00	202,4
Frutos secos	1,50	795,6
Olivar	1,70	5898,0
Viñedo	3,50	6084,7
Otros	1,00	183,5
Frutales		14049,2
Girasol	1,32	567,9
Algodón	2,15	271,4
Caña azucar	25,75	160,3
Cultivos Ind.	1,99	999,6

TABLA I : Rendimientos y producción en residuos agrícolas de algunos cultivos (Martínez y Rodríguez, 1985).

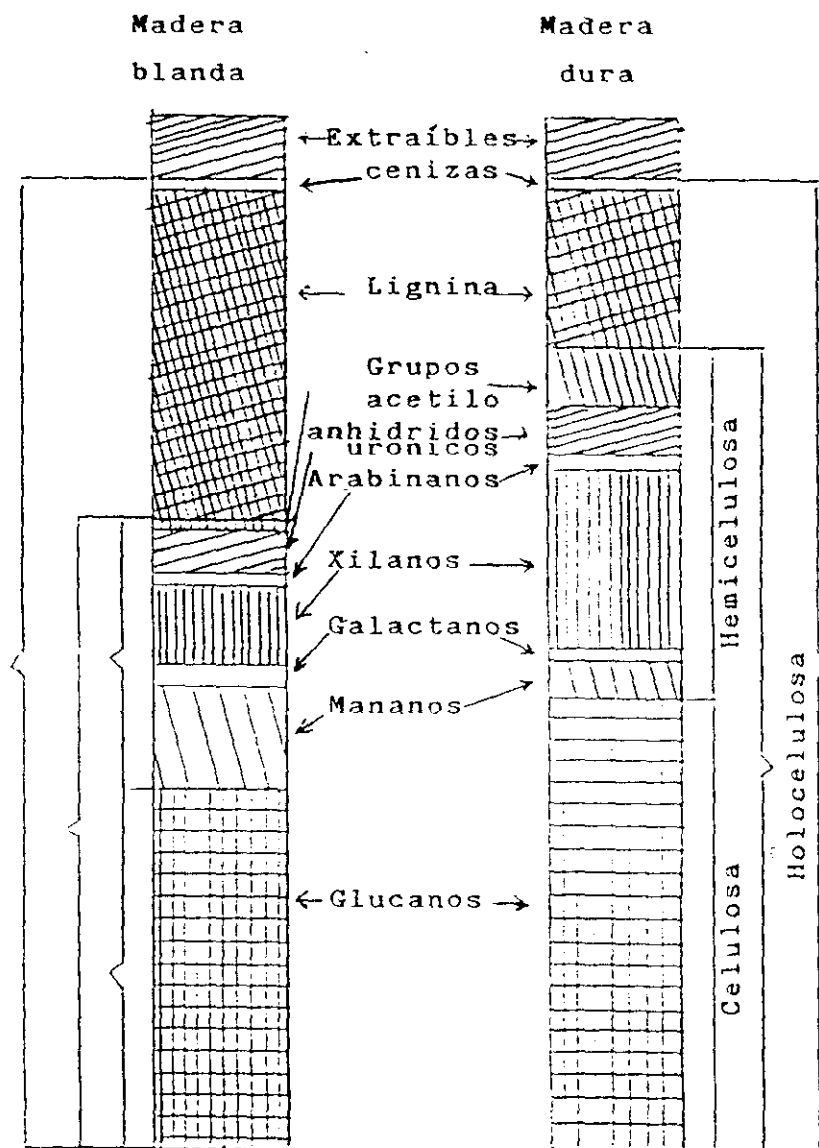


Figura 1. Comparación de la composición de maderas duras y maderas blandas.

En cuanto al volumen de producciones, el que ocupa el primer lugar es el grupo de los cereales grano con un 53,3% del total, seguido de los frutales (43,6%) y de los cultivos industriales (3,1%). Los residuos de trigo, cebada y maíz

Tipo de residuo	Celulosa %	Hemicelulosa %	Lignina %
Maderas blandas	45-50	25-35	25-35
Maderas duras	40-55	25-40	18-25
Pajas de trigo, arroz, caña de azúcar.	25-40	25-40	10-30

TABLA II. Composición media de algunos residuos agrícolas lignocelulósicos. (Fuente: Martínez y Rodríguez, 1985).

constituyen el 48,1% del total de los residuos agrícolas y el 90% del total de residuos procedentes de cereales grano. Dentro de los cultivos frutales generadores de residuos los más importantes son el olivar y el viñedo con un 42% y 43,3% respectivamente de la producción de dichos cultivos, y que suponen un 37,1% del total de los residuos agrícolas. Los cultivos industriales son los que producen menos residuos dada la poca extensión de los mismos en nuestro país. El girasol y el algodón son los cultivos de mayor importancia, seguidos de la caña de azúcar.

En el caso de residuos forestales, entre los que se incluyen los residuos de las industrias de la transformación primaria de la madera, la producción anual en España alcanza aproximadamente 5,1 Mt. El tonelaje de estos residuos podría aumentarse en 2,7 veces, si se limpiasen los bosques españoles con una frecuencia de 10 años, que es, según los

expertos, la periodicidad correcta para dicha actividad. En la tabla III, se dan los datos generales de producción y los valores de residuos forestales generados, según un informe del Comité de la Energía (1982).

DATOS GENERALES:

Superficie geográfica (ha).....	50.210.800
Superficie arbolada (ha).....	11.702.538
Corta anual m /c.c.....	5.391.597
Corta anual (t).....	3.234.951,8
Producción de ramas (t).....	736.063,8
Producción de leña (t).....	240.825,2

RESIDUOS DE CORTA Y ELABORACION DE LA MADERA:

Total (Mt).....	2.306,5
-------------------	---------

RESIDUOS FORESTALES:

Residuos totales (Miles de t/año). .	14.098,7
--------------------------------------	----------

TABLA III: Datos de producción de residuos forestales en España.
(Informe del Comité de Energía, 1982).

Con respecto a los residuos industriales, hay que señalar que éstos están poco catalogados en nuestro país, no existiendo en el momento informaciones detalladas sobre su composición y la cantidad generada en los distintos sectores industriales. Centrándonos en la producción de residuos celulósicos que son los que aquí nos interesan, el sector de las conservas vegetales es el que tiene una mayor incidencia en el volumen de dichos residuos.

La producción total de residuos agrícolas es aproximadamente el 43,5% del total de la biomasa residual en nuestro país, mientras que el 6,9% corresponde a residuos forestales. El 49,6% restante corresponde a residuos ganaderos, sólidos urbanos e industriales.

En relación con los cultivos agroenergéticos, se han promovido en el mundo en los últimos años, programas de investigación y desarrollo para la búsqueda de especies botánicas de características apropiadas para la obtención, mediante procesos diversos de transfor-

mación, de combustibles o productos químicos de alto valor añadido. El volumen y la incidencia futura de estos cultivos en las cifras globales de producción de biomasa dependerá de los resultados obtenidos, así como de las necesidades concretas del momento.

Los problemas ligados a los procesos de transformación de materiales lignocelulósicos son, en sus aspectos básicos, semejantes para todos ellos, por lo que los estudios realizados con cualquiera de estos sustratos pueden hacerse, en líneas generales, extensivos al resto. En nuestro caso, el trabajo desarrollado se ha centrado en el estudio del aprovechamiento y transformación de la biomasa lignocelulósica de *Onopordum nervosum*, especie con la que se viene trabajando, desde hace unos años, en nuestro país, como posible cultivo agroenergético por diversas razones. Esta especie, endémica de la península Ibérica, con una productividad total en materia seca anual de alrededor de 20 t/ha (Fernández, 1980), presenta unas características de composición y rusticidad que le hacen muy apropiada para su utilización como fuente de celulosa, así como para su cultivo en zonas marginales, no aptas para cultivos tradicionales, de las que existen en nuestro país unos 18 millones de hectáreas. Es por ésto, por lo que al estudio de las características agronómicas y de los procesos de transformación de ésta y otras especies de similares características, se ha dedicado una especial atención en nuestro grupo de trabajo, como parte del programa de investigación sobre utilización de biomasa lignocelulósica como fuente de energía y productos diversos.

1.1.2. Composición y estructura de los materiales lignocelulósicos.

Los materiales lignocelulósicos están formados fundamentalmente por tres componentes:

a) Polisacáridos.

Entre los que se encuentran la celulosa y la hemicelulosa, carbohidratos de alto peso molecular que constituyen del 60 al 80% del total de la composición de los materiales lignocelulósicos.

La celulosa es el principal componente de la pared celular de la fibra vegetal y es un polímero lineal de D-Glucosa, con peso molecular de aproximadamente medio millón. Las unidades individuales de la molécula están ligadas por enlaces β (1 \rightarrow 4) formando cadenas que a su vez se agrupan en estructuras superiores de alto grado de cristalinidad.

La hemicelulosa está compuesta de pequeñas cadenas de polisacáridos cuyo papel es suministrar una unión entre la lignina y la celulosa. En su estado natural existe en forma amorfa con un grado de polimerización que no excede de 200 y puede ser dividida en dos categorías: celulosanos y poliurónidos. Los celulosanos incluyen aquellas hemicelulosas que

son polímeros de hexosas tales como manosa, galactosa y glucosa y pentosas tales como xilosa y arabinosa. Los poliuronidos son hemicelulosas que contienen grandes cantidades de ácidos hexurónicos y algunos grupos metoxilo, acetilo y carboxilo libres.

b) Lignina.

Es un polímero tridimensional de unidades de fenilpropano ligadas por enlaces éster y C-C. La lignina confiere rigidez estructural al endurecer y sostener las fibras de polisacáridos.

c) Otras sustancias.

Comprenden aquellos materiales no englobados en los apartados anteriores y que en función de su solubilidad en agua o solventes orgánicos neutros se pueden clasificar en: extraíbles y no extraíbles. Dentro de la fracción extraíble, se encuentran los terpenos que son polímeros de isopreno y tienen importancia dado que son fuente de terpenina en procesos industriales, las resinas, que incluyen gran variedad de compuestos no volátiles como grasas, ácidos grasos, alcoholes, resinas ácidas, fitosterol, etc. y los fenoles, entre los que se encuentran los taninos. También dentro de esta fracción extraíble se pueden incluir carbohidratos de bajo peso molecular, alcaloides y lignina soluble.

En la fracción no extraíble se encuentran las sustancias minerales o cenizas. Son principalmente carbonatos alcalinos, alcalinotérreos y oxalatos. Otro componente importante de esta fracción lo constituye la sílice que se deposita generalmente, en forma de cristal y es muy abundante en la paja. Pequeñas cantidades de sustancias tales como almidón, pectina y proteínas se encuentran asimismo dentro de la fracción no extraíble.

1.1.2.1. Estructura de la celulosa, hemicelulosa y lignina.

Es, en general, aceptado que la celulosa es un polímero lineal de unidades de D-anhidrogluco-piranósido, unido por enlaces β -1-4-glucosídicos. Es decir, se trata de un 1-4- β -D-glucano (figura 2). El anillo de piranosa está en la conformación 4C_1 , lo cual quiere decir que los grupos $-CH_2OH$ y $-OH$ así como los enlaces glucosídicos están todos en posición ecuatorial con respecto al plano medio del anillo.

Cuando la molécula de celulosa está completamente extendida y toma forma de cinta aplanada, con los grupos $-OH$ sobresaliendo lateralmente, se pueden formar puentes de hidrógeno inter e intramoleculares. La superficie de la cinta que consiste en átomos de hidrógeno unidos directamente a carbono es hidrofóbica. Estos dos aspectos de la estructura

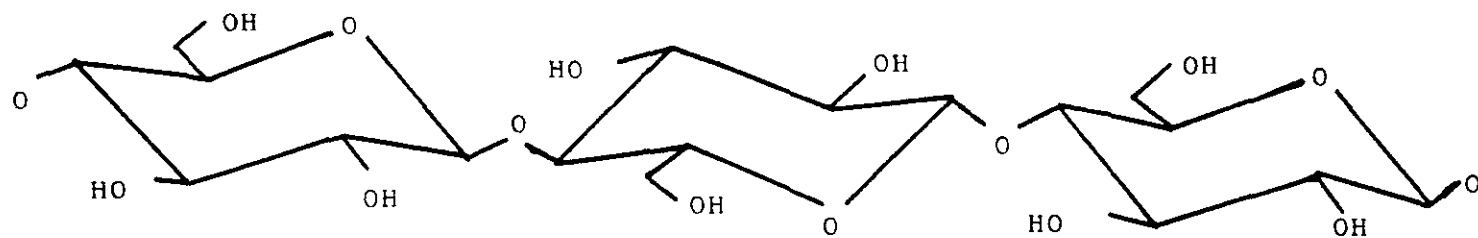


Figura 2: Representación de la estructura primaria de la celulosa.

molecular son responsables de su estructura supramolecular, y determinan muchas de las propiedades físicas y químicas de la celulosa. El número de unidades de glucosa por molécula (grado de polimerización) varía desde 1000 hasta 15000D, dependiendo de su origen y de la extensión de su posible degradación durante el aislamiento.

Los estudios de espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear y difracción de rayos X revelan que los puentes de hidrógeno intramoleculares se establecen entre los grupos hidroxilo en posición 3 y los átomos de oxígeno de las glucosas adyacentes y entre los grupos hidroxilo en posición 6 y los oxígenos de las cadenas adyacentes (figura 3). Aunque, considerados individualmente, estos puentes de hidrógeno son enlaces débiles, la gran cantidad de ellos que se establece entre las cadenas de glucosa que componen las fibras de celulosa, le proporcionan una unión fuerte que es la responsable de la formación de agregados cristalinos que confieren a la pared celular su enorme resistencia.

Las hemicelulosas, como las celulosas, son polímeros de unidades de anhidroazúcar ligadas por enlaces glucosídicos. Sin embargo, cada molécula de hemicelulosa está formada por más de un tipo de azúcar (hexosas o pentosas) y además presentan ramificaciones y sustituciones. Todas estas características le confieren una estructura, en general, no cristalina. En el caso de angiospermas, sus hemicelulosas son mayoritariamente de tipo xilano, polímero de unidades de D-xilopiranosas (aproximadamente un 35% de sus residuos están acetilados) unidos por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. En el caso concreto de las plantas dicotiledóneas, algunos restos de xilosa se encuentran sustituidos por 4-O-metilglucurónico (figura 4a). Otra fracción importante de las hemicelulosas de angiospermas (25% del total de hemicelulosas aproximadamente) la constituyen los glucomananos que son polímeros lineales de glucosa y manosa con predominio de esta última. Polisacáridos relacionados con los anteriores son los galactoglucomananos acetilados que se encuentran principalmente en los tejidos de gimnospermas (figura 4b). Las hemicelulosas minoritarias son arabino-4-O-metil glucuronoxilanos, los cuales son similares al xilano de angiospermas, pero sustituidos con ramificaciones de arabinosa.

La lignina es el tercer componente mayoritario de los materiales lignocelulósicos. Es un polímero aromático sintetizado por polimerización oxidativa de tres alcoholes cinamílicos: cumarol, coniferol y sinapol (alcohol 4-hidroxi, 4-hidroxi-3-metoxi y 4-hidroxi-3,5-dimetiloxicinámico respectivamente). La proporción de los tres alcoholes precursores difiere según se trate de angiospermas o gimnospermas, así como de los grupos taxonómicos, particularmente entre las primeras. En la lignina de gimnospermas, el 90% corresponde a derivados de coniferol, mientras que en la de angiospermas corresponde a derivados del coniferol y del sinapol en proporciones similares (figura 5).

Estos tres componentes fundamentales de los materiales lignocelulósicos se encuentran localizados en la pared de las células vegetales cuya estructura se describe en el siguiente apartado.

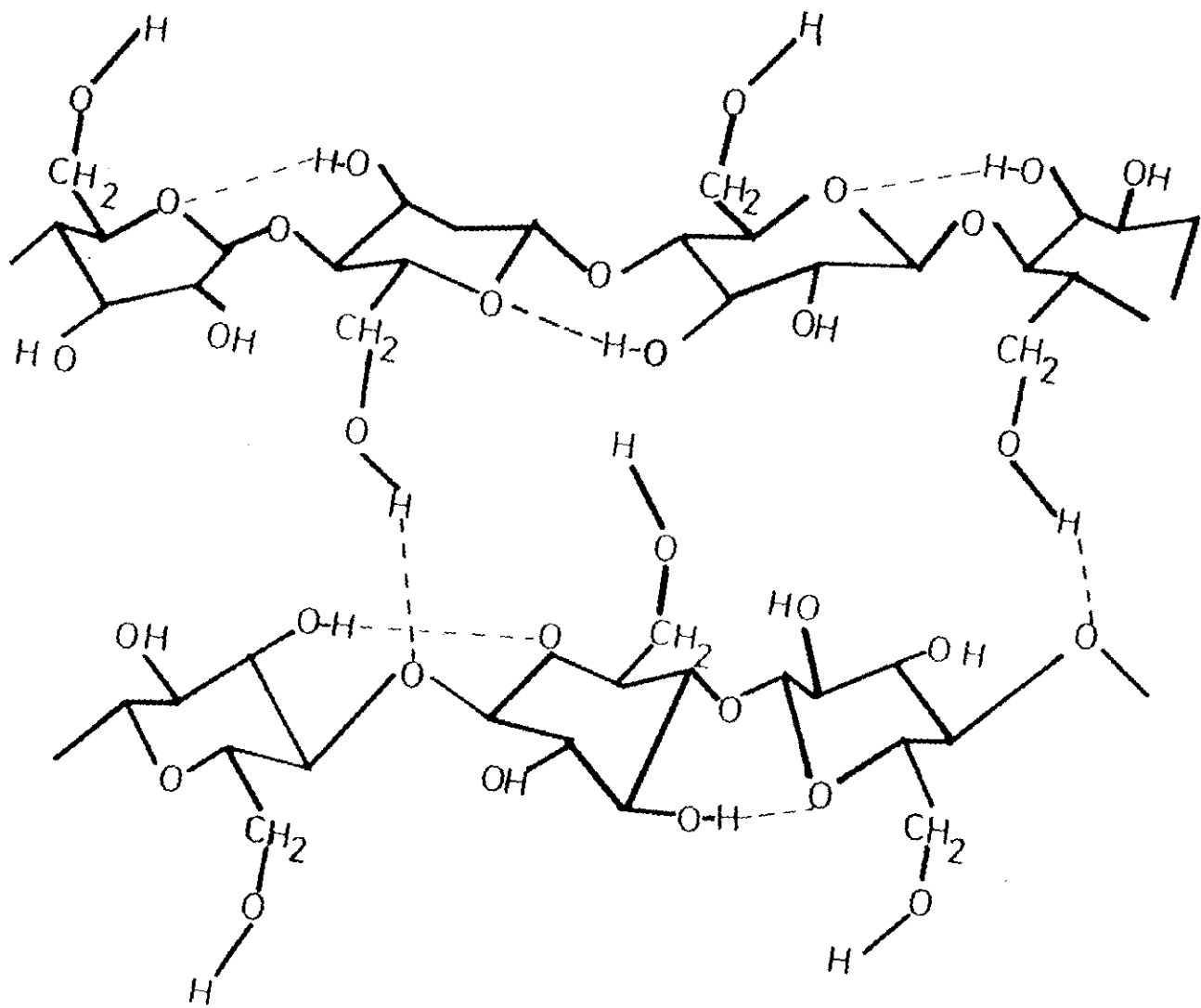
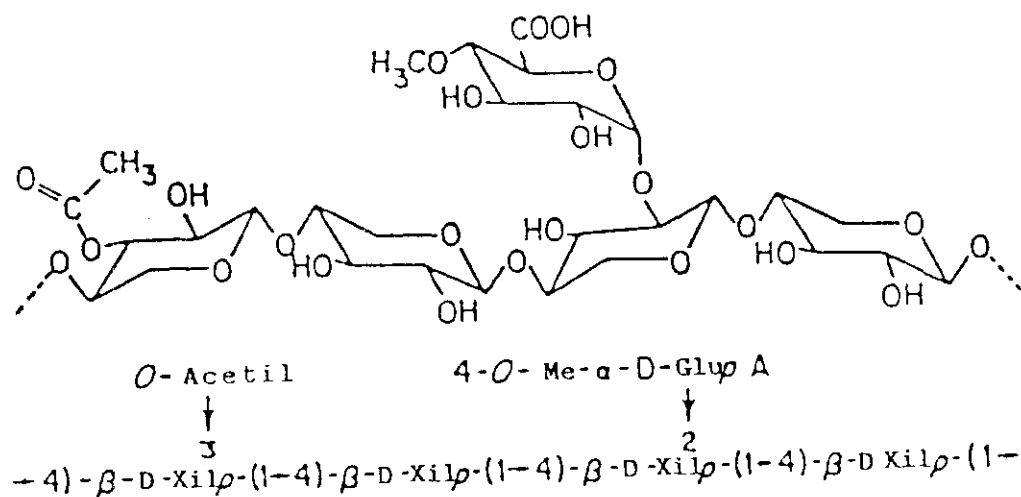
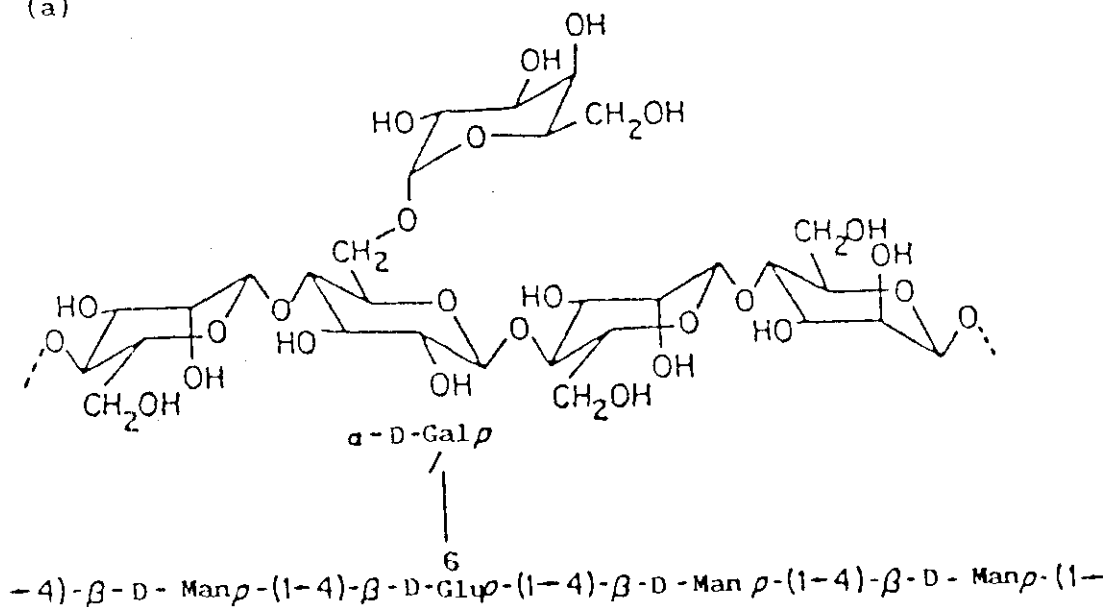


Figura 3. Estructura de la celulosa.



(a)



(b)

Figura 4. (a) Estructura del O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano.
Hemicelulosas de tejidos de angiospermas.
(b) Estructura del O-acetil-galactoglucomanano.
Hemicelulosas de tejidos de gimnospermas.

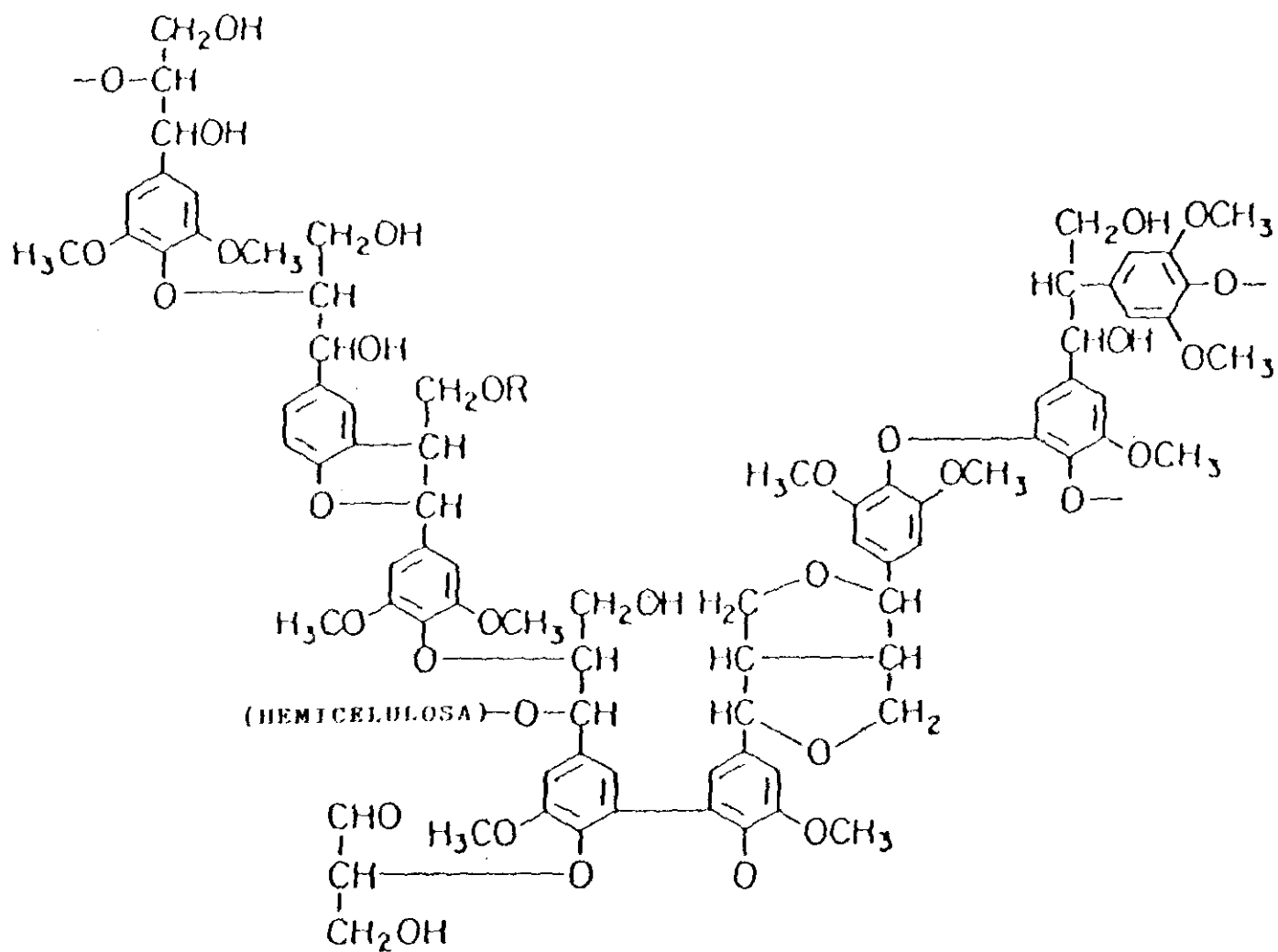


Figura 5. Estructura de la lignina.

1.1.2.2. Organización de la pared celular.

El estudio de la arquitectura de la pared celular vegetal revela la existencia de cuatro capas concéntricas morfológicamente distintas (figura 6). La capa externa llamada pared primaria con un espesor de 0,1 mm contiene la tercera parte del contenido total de celulosa. En esta capa, las microfibrillas elementales de celulosa se encuentran orientadas transversalmente a lo largo del eje de la fibra. La capa siguiente es la pared secundaria, que se forma durante el crecimiento y maduración de la célula y contiene tres subcapas, originadas en distintas fases del desarrollo, la exterior S₁, la capa intermedia S₂ y la capa más interior S₃. Cada una de estas subcapas contiene microfibrillas con distintas ordenaciones que dan lugar a la apariencia laminar de la pared celular. Internamente a la pared secundaria se encuentra el lumen, que es la porción de célula viva que contiene las sustancias intracelulares.

La microfibrilla se puede definir como la unidad elemental del tejido fibroso vegetal y contiene la mayor parte de la celulosa que constituye las distintas capas y subcapas de la pared celular (la proporción más elevada del total de celulosa se encuentra localizada en la subcapa S₂ de la pared secundaria). La sección de una microfibrilla es de unos 120Å por término medio y su longitud ilimitada. Estas microfibrillas están a su vez constituídas por fibrillas elementales que se unen lateralmente para dar lugar a la estructura superior. Los otros componentes de la fibra, hemicelulosas y lignina, están localizados entre las microfibrillas. La lignina se encuentra también en la lámina intermedia que es la capa que rodea la célula vegetal, así como en los espacios situados entre las fibras. En la figura 7 se muestra la distribución de los componentes químicos de una pared celular típica.

Con respecto a la estructura última de las cadenas celulósicas que constituyen las microfibrillas, la difracción de rayos X y otras técnicas muestran que estas son parcialmente cristalinas y parcialmente amorfas. Se considera que por término medio la celulosa natural contiene 15% de zonas amorfas y 85% de zonas cristalinas (figura 8). Aunque se han sugerido modelos de ordenamientos moleculares para explicar la estructura cristalina de la celulosa, ésta no está todavía clara (Chang, 1971).

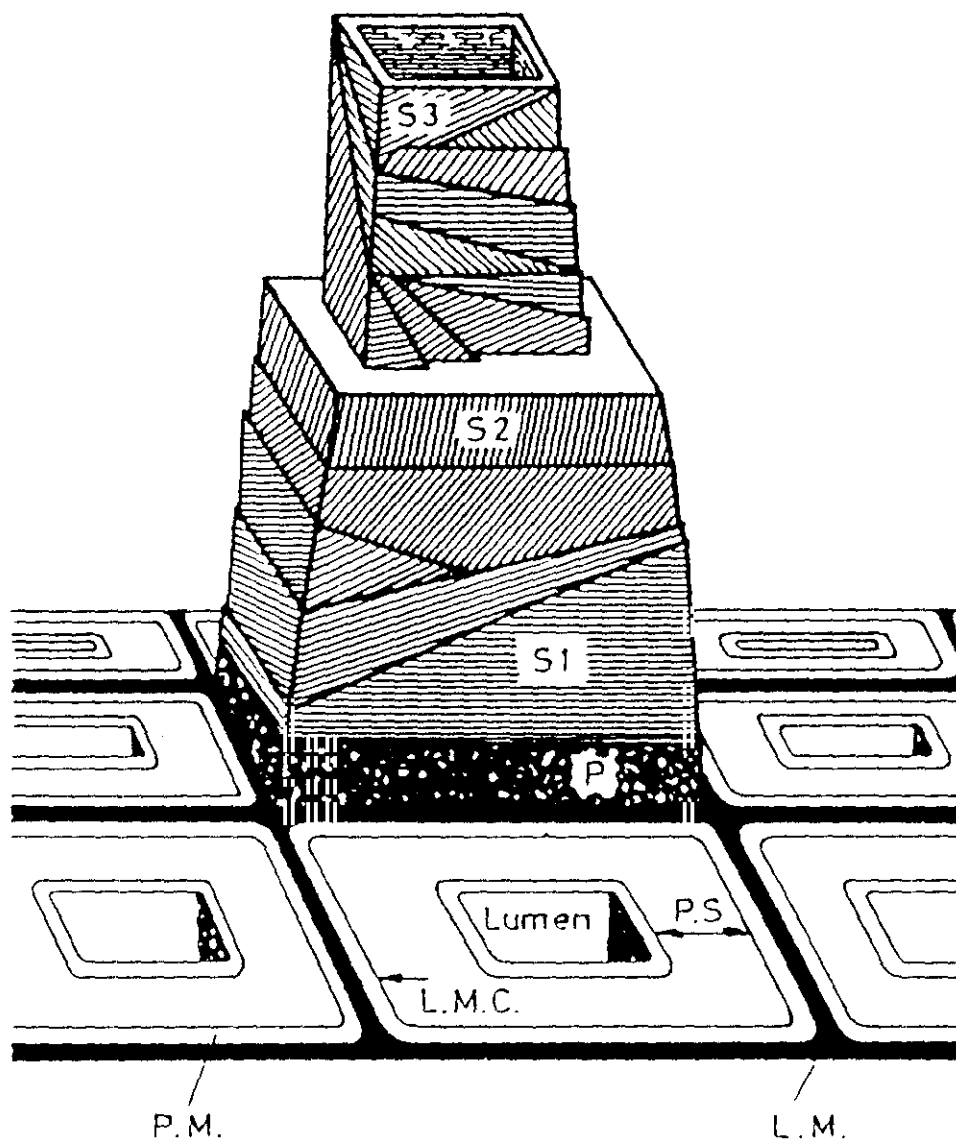


Figura 6. Esquema de la arquitectura de la pared celular característica de las fibras vegetales.

L.M. (lámina media), L.M.C. (lámina media central), P.M. (pared primaria), P.S. (pared secundaria).

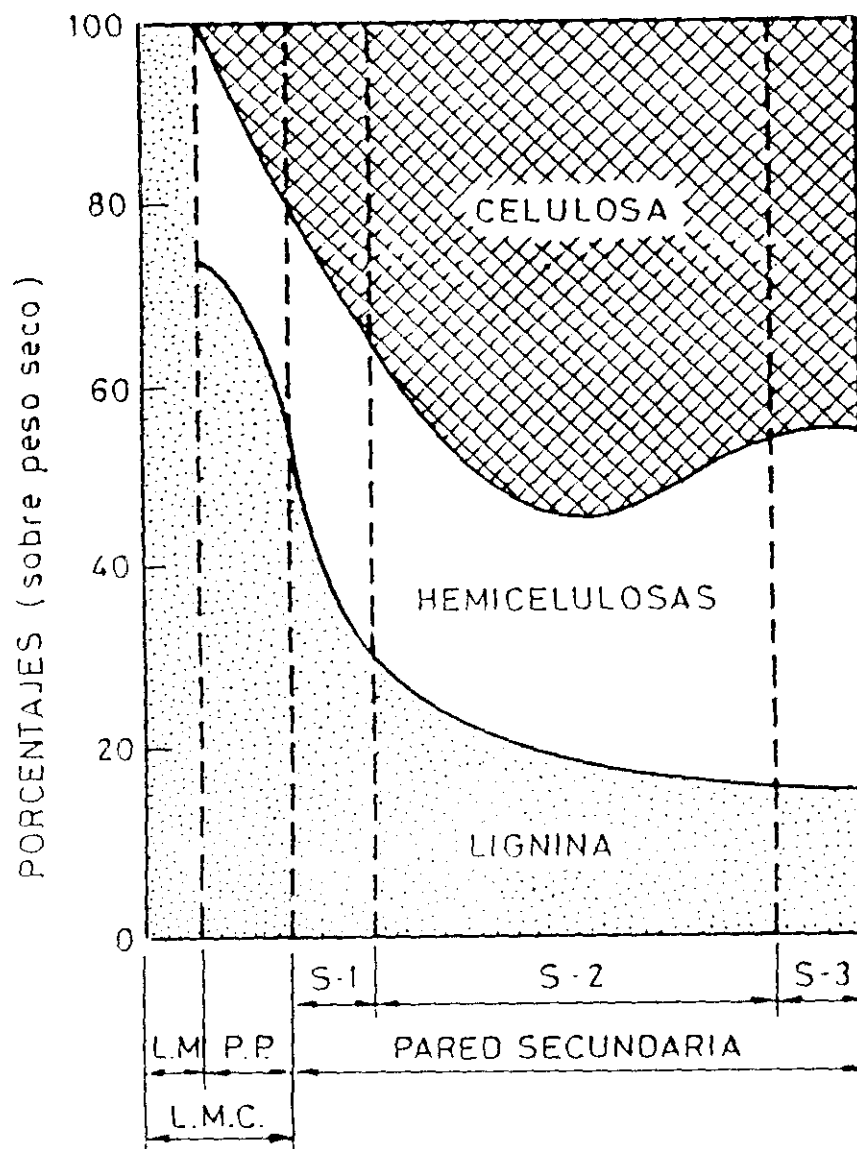


Figura 7. Distribución aproximada de los constituyentes químicos en las distintas capas de la pared celular.

L.M. (lámina media), L.M.C. (lámina media compuesta), P.P. (pared primaria).

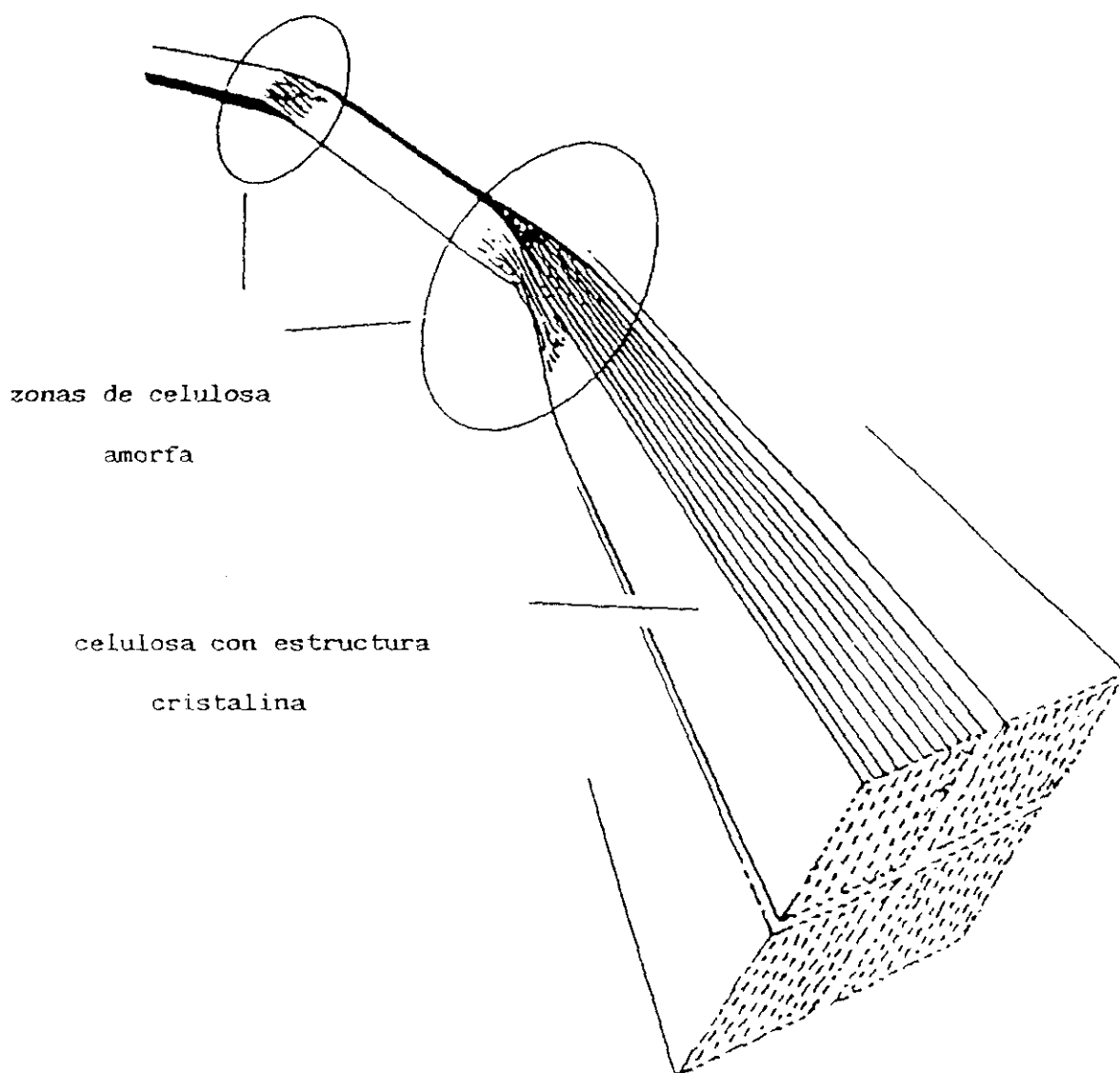


Figura 8. Organización de la celulosa en la fibra.

1.2. PROCESOS DE TRANSFORMACION DE LOS MATERIALES LIGNOCELULOSICOS.

La celulosa y los materiales lignocelulósicos en general, han sido profusamente utilizados a lo largo de la historia de la humanidad en diferentes actividades y con finalidades diversas tales como combustible o materia prima de industrias de construcción, papeleras o textiles. A estas aplicaciones tradicionales, se añade hoy día un gran interés por el estudio de estos materiales como fuente de productos químicos y energía que podrían en su momento sustituir, en buena medida a los de origen fósil no renovable (Allen y Sjöström, 1985).

Los procesos de transformación de los materiales lignocelulósicos pueden tener una finalidad eminentemente energética, como es el caso de los procesos termoquímicos de gasificación, pirólisis o combustión directa, o bien tener por objeto la obtención de materiales transformados o productos químicos que pueden ser o no utilizados como fuente de energía. En este último grupo se encontrarían las vías químicas, bioquímicas o biológicas de transformación.

Los procesos termoquímicos agrupan los tradicionales de combustión directa así como los procesos de gasificación y pirólisis que requieren para su desarrollo la puesta a punto de tecnología más complicada. La combustión directa había quedado relegada, en la sociedad industrial moderna, a zonas rurales y países poco desarrollados, pero en la actualidad ha empezado a introducirse en algunas industrias de EEUU y Europa en sistemas de cogeneración con producción simultánea de vapor y electricidad, hornos de secado, calefacción de viviendas, etc. En el caso de gasificación o pirólisis, el objetivo es la obtención de combustibles líquidos, sólidos o gaseosos cuyas densidades caloríficas son bastante más elevadas que la de los materiales lignocelulósicos de partida, con lo cual se facilita el transporte y por tanto su utilización energética en puntos alejados de los núcleos en los que dichos materiales se generan.

Los otros esquemas de transformación de la biomasa lignocelulósica pueden pretender la modificación de la estructura y propiedades de dicho material o su descomposición total o parcial en las unidades que lo constituyen, fundamentalmente, glucosa o pentosas para su utilización con fines diversos. En el primer grupo, están los procesos de fermentación en estado sólido cuyo objetivo es el desarrollo de determinadas poblaciones microbianas sobre los sustratos lignocelulósicos, con lo cual se produce una digestión parcial de estos sustratos y un aumento de su contenido en nitrógeno. Dependiendo del tipo de sustrato, de las especies microbianas y de las condiciones de cultivo elegidas, se puede conseguir un

producto final enriquecido y de mayor digestibilidad, apropiado para la alimentación animal, como en el caso de residuos lignocelulósicos tratados con especies de hongos celulolíticos del género *Chaetomium* o *Trichoderma*, o bien, un producto de características agrobiológicas adecuadas para ser empleado como fertilizante o enmienda orgánica, denominado genéricamente compost.

La otra posibilidad de transformación de materiales lignocelulósicos es la de hidrolizar por vía química o enzimática las fracciones celulósica y hemicelulósica para obtener los azúcares, fundamentalmente glucosa y algunas pentosas, que los constituyen. Estos azúcares pueden ser utilizados como tal o bien sometidos a procesos posteriores de transformación química o biológica. En el caso de hidrólisis química, se emplean ácidos como HCl, H₂SO₄ o HF a altas concentraciones o bajas concentraciones y altas temperaturas y diversos procesos operativos, tales como percoladores, reactores de mezcla completa, reactores de flujo pistón, etc., desarrollados como resultado de diversos estudios (Thompson y Grethelein, 1979; Wright y D'Agincourt, 1984; Wright y Wyman, 1987; Bergeron y Werdene, 1989; Calo y Hradil, 1989; Wyman, 1989). Además de algunas plantas de demostración en Japón se sabe que existen unas 40 plantas industriales en la Unión Soviética. Los principales inconvenientes de este proceso de transformación radican en la heterogeneidad del hidrolizado obtenido debida a la hidrólisis inespecífica de las distintas fracciones del material, así como a la aparición, en mayor o menor proporción, de productos de degradación de azúcares que se generan durante el proceso. Por otra parte, la necesidad de utilizar materiales resistentes a la corrosión y de recuperar los ácidos utilizados encarecen en gran medida los costes de inversión y operación.

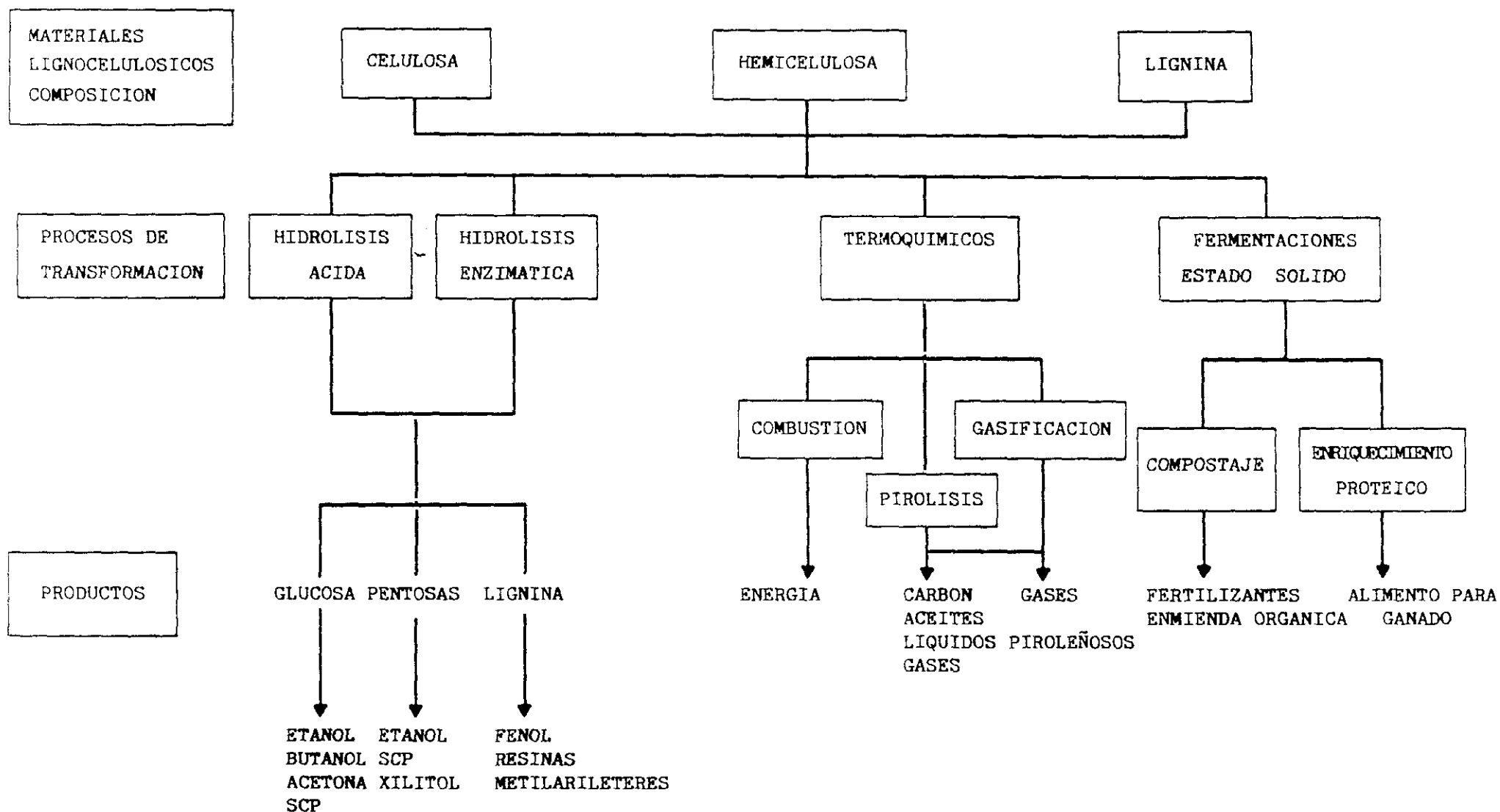
La hidrólisis enzimática de la celulosa consiste en la utilización de las enzimas celulolíticas, producidas por algunos hongos y bacterias, para obtener una solución de glucosa a partir de dicho sustrato que es originalmente insoluble. A diferencia de la hidrólisis química, la enzimática proporciona un hidrolizado homogéneo debido a la alta especificidad de las enzimas. Sin embargo, y por causa de la propia estructura de la celulosa y de la barrera que supone la fracción de lignina, los rendimientos de este tipo de procesos suelen ser bajos. Puesto que la hidrólisis enzimática de determinados materiales lignocelulósicos es el objetivo primordial de este trabajo, se discuten más adelante todos los problemas que se plantean en esta vía de transformación y las soluciones que se han ido aportando para su puesta a punto.

Los azúcares obtenidos en un proceso de hidrólisis, ácida o enzimática, pueden ser utilizados como tales o sometidos a transformaciones posteriores. Estas transformaciones, incluyen fermentaciones diversas cuyos objetivos pueden ser la obtención de productos tales como etanol, butanol, acetona, ácido cítrico, etc., o bien la producción de biomasa unicelular (denominada genéricamente proteína unicelular o SCP) que puede ser utilizada con fines de alimentación animal y humana (Linko, 1977 ; Bisaria y Ghose, 1981; Chang y col., 1981 ; Enari, 1983). Como es evidente, los productos orgánicos antes mencionados pueden ser a su vez materia prima para la industria química de transformación con lo cual la biomasa se convierte, así, en fuente de un amplio espectro de productos químicos.

Para finalizar hay que añadir que cualquier proceso que pretenda el aprovechamiento de materiales lignocelulósicos debería contemplar, por razones evidentes, la utilización no sólo de la fracción celulósica sino también de hemicelulosas y ligninas. Estas fracciones además del alto porcentaje en que entran a formar parte de dichos materiales, constituyen por su composición una fuente interesante de productos químicos. En el caso de la lignina aparte de servir como combustible que puede aportar una parte de las necesidades energéticas del proceso, puede ser también utilizada como materia prima de diversos tratamientos químicos destinados a la obtención de coque de lignina, metanol, vainillina, fenoles, sulfuro de dimetilo, etc. Además, la lignina y sus derivados tienen diversas aplicaciones como resinas de intercambio iónico, agentes dispersantes y como sustrato para fabricación de polímeros, colorantes, detergentes, pesticidas, etc.

En la figura 9 se muestra un esquema de los diversos procesos de transformación de materiales lignocelulósicos así como de los principales productos que se pueden obtener de ellos. Aunque muchos de ellos no se desarrollan a escala industrial en la actualidad, el gran abanico de posibilidades que ofrecen estos materiales hace posible que en un futuro próximo se desarrollen procesos para el aprovechamiento integral de los mismos.

Figura 9: Procesos de transformación de materiales lignocelulósicos



1.3. TRANSFORMACION DE MATERIALES LIGNOCELULOSICOS POR HIDROLISIS ENZIMATICA.

La biodegradación de la celulosa constituye una etapa esencial en el ciclo del carbono mediante la cual se mantiene el balance de este elemento en la biosfera. El grupo de enzimas, responsable último de este proceso se denomina genéricamente "celulasas" y corresponde en realidad a una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce finalmente la degradación de la celulosa nativa.

Las celulasas son producidas por plantas superiores, algunos invertebrados y fundamentalmente por microorganismos como bacterias y hongos. Las plantas superiores producen celulasas como agentes morfogénicos con objeto de debilitar las paredes celulares ricas en celulosa en las etapas de crecimiento, diferenciación o abscisión. También son producidas por algunos patógenos de plantas para facilitar la penetración en la misma y la invasión posterior de los tejidos. En el caso de microorganismos se producen celulasas como agentes digestivos que permiten la utilización de la celulosa como fuente de carbono para su propio desarrollo. Las celulasas de microorganismos y concretamente las de origen fúngico han sido las más ampliamente estudiadas por la capacidad de éstos de producirlas en grandes cantidades y de forma extracelular, lo que facilita su separación en los medios de cultivo.

El estudio de las celulasas y de los organismos que las producen se potenció extraordinariamente a partir de los años 60, cuando empezó a considerarse como una opción interesante la utilización de la celulosa, para su transformación en productos valiosos desde el punto de vista energético o químico. Aunque la transformación de la celulosa por vía química (hidrólisis ácida) había sido estudiada con mucha anterioridad e incluso empleada a nivel industrial, en distintos países, la posibilidad de hidrolizar la celulosa con unos agentes mucho más selectivos y unas condiciones de operación mucho más suaves, animó la investigación del proceso de hidrólisis enzimática en la que fueron pioneros los trabajos realizados en los laboratorios del ejército americano en NATICK y que posteriormente, se extendió a otros muchos laboratorios en otras partes del mundo.

Para situar el estado de desarrollo de este tipo de procesos, las posibilidades que ofrecen y los problemas que quedan aún por resolver, a continuación se incluye un breve repaso de cada una de las etapas que constituyen un proceso completo de hidrólisis enzimática, a saber: producción de enzimas, pretratamiento del sustrato a hidrolizar y fase de hidrólisis propiamente dicha.

1.3.1. Producción de celulasas.

1.3.1.1. Características del complejo celulolítico.

1.3.1.1.1. Composición.

El complejo celulolítico, conjunto de enzimas capaces de hidrolizar la celulosa, está formado por distintos componentes que actúan sinérgicamente. Hoy está aceptado que este sistema enzimático tiene tres tipos diferentes de actividad cuya denominación y mecanismo de acción son los siguientes:

1. Endo- β -glucanasas:

β -(1,4)-glucanglucanohidrolasa (EC 3.2.1.4.)

2. Exo- β -glucanasas:

a) β -(1,4)-glucancelobiohidrolasa (CBH) (EC 3.2.1.91) (celobiohidrolasa).

b) β -(1,4)-glucanglucohidrolasa (GGH) (EC. 3.2.1.74.) (glucohidrolasa)

3. β -glucosidasa (EC. 3.2.1.21)

La endoenzima actúa al azar en el interior del polímero hidrolizando enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y generando nuevos finales de cadena no reductores. Puede actuar sobre celodextrinas y derivados sustituidos como carboximetilcelulosa (CMC) e hidroxietilcelulosa (HEC), así como sobre celulosa amorfa, pero no actúa ni sobre celulosa cristalina ni sobre celobiosa. Supone aproximadamente un 20% del total de proteínas del complejo. La actividad de esta enzima se ensaya con celulosa soluble y se determina por el incremento de azúcares reductores o por la disminución de la viscosidad del medio de reacción.

La celobiohidrolasa actúa sobre los extremos no reductores de la cadena generados por la endoglucanasa liberando moléculas de celobiosa. Esta enzima tiene actividad sobre celulosa cristalina y amorfa y sobre celodextrinas, pero no actúa sobre derivados sustituidos ni sobre celobiosa. Entre el 50% y el 80% del sistema celulolítico, lo constituye esta enzima. Su actividad se determina por incubación con celulosa cristalina. La otra exoglucanasa, la glucohidrolasa, se encuentra en poca proporción y actúa sobre los extremos no reductores liberando unidades de glucosa. Tiene actividad frente a celulosa amorfa, celooligosacáridos y CMC.

La β -glucosidasa hidroliza celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño y es absolutamente necesaria para evitar la fuerte inhibición que sobre la endoglucanasa y exoglucanasa produciría la celobiosa si se acumulara en el medio de reacción. Su actividad se determina sobre celobiosa y 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido, cuantificando la glucosa o el 4-nitrofenol liberados, respectivamente, en el medio de reacción.

Las propiedades de los distintos componentes de un complejo enzimático varían en gran medida según el origen del mismo, las condiciones de cultivo de los microorganismos productores e incluso la manipulación de los medios. La separación y la purificación de las distintas fracciones enzimáticas por técnicas tales como ultrafiltración, cromatografía, electroforesis, etc., revelan la existencia dentro de dicho grupo de diversos isoenzimas cuyo número depende no sólo del proceso de producción utilizado sino también de los esquemas seguidos para la separación de dichas fracciones.

La mayor parte de los estudios realizados muestran que las endoglucanasas y exoglucanasas son glucoproteínas con un contenido en hidratos de carbono que puede alcanzar incluso el 33% del peso molecular total. Algunos autores también han encontrado una pequeña proporción de carbohidratos en la composición de la β -glucosidasa. Sin embargo, la caracterización exacta de las distintas fracciones no es sencilla tal y como lo demuestran las diferencias encontradas en los valores de composición de aminoácidos, contenido en carbohidratos, Pm, punto isoelectrico, etc. Estos resultados, obtenidos por distintos grupos de investigación para distintos microorganismos celulolíticos, algunos de los cuales se recogen en las tablas IV, V y VI, ponen de manifiesto la variabilidad del complejo enzimático responsable de la hidrólisis de la celulosa.

Organismo	Enzima	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico	Contenido Carbohidratos (%)
Trichoderma reesei	CBHI	60.000	3,9	(+)
	CBHII	60.000	5,6	(+)
Trichoderma koningii	CBHI	62.000	3,8	33
	CBHII	62.000	3,95	9
Phanerochaete chrysosporium	CBH	48.600	4,3	0

+) Presencia de carbohidratos, pero no se dan datos.

TABLA IV: Celobiohidrolasas de hongos. (Enari, 1983).

Organismo	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico	Contenido Carbohidratos (%)
Trichoderma reesei	47.700	5,74	0
Trichoderma reesei	35.000 130.000	(-) (-)	0,01 (-)
Trichoderma koningii	39.800 39.800	5,53 5,83	0 1-2
Phanerochaete chrysosporium	165.000-172.000 175.000-182.000	(-) (-)	(-) (-)
Aspergillus oryzae	218.000	4,3	10
Aspergillus niger	150.000	(-)	0,03

(-) no se dan datos del posible contenido en carbohidratos.

TABLA V: β -Glucosidasa de hongos. (Enari, 1983).

Organismo	Enzima	Peso	Punto	Contenido
		Molecular	Isoeléctrico	Carbohidratos (%)
Trichoderma reesei	I	20.000	7,5	(-)
	II	40.000	4,6	0
Trichoderma koningii	E1	13.000	4,72	(-)
	E3a	48.000	4,32	(-)
	E3b	48.000	4,32	(-)
	E4	31.000	5,09	(-)
Phanerochaete chrysosporium	T1	32.300	5,32	10,5
	T2a	36.700	4,72	0
	T2b	28.300	4,40	7,8
	T3a	37.500	4,65	4,7
	T3b	37.000	4,20	2,2

(-) No se dan datos del posible contenido de carbohidratos.

TABLA VI: Endoglucanasas de hongos. (Enari, 1983).

1.3.1.1.2. Modo de acción de las celulasas.

Los primeros postulados acerca de la naturaleza del mecanismo de hidrólisis enzimática fueron enunciados por Reese y col. (1950) basados en el hecho de que algunos organismos podían hidrolizar celulosa nativa mientras que otros, sólo hidrolizaban derivados solubles. Se pensó que era un proceso en dos etapas. En la primera de ellas, un componente enzimático, al que se denominó C1 iniciaría la hidrólisis enzimática por activación de las cadenas de celulosa, y en la segunda, actuaría un componente Cx que sería el responsable de la despolimerización y formación de oligosacáridos solubles.

De acuerdo con esta hipótesis, los microorganismos capaces de crecer en celulosa nativa cristalina formarían enzimas de tipo C1 y Cx, mientras que los microorganismos que degradaban solamente celulosas modificadas o sustituidas tales como CMC carecerían de la primera de ellas. El mecanismo propuesto por Reese y col. (1950) era el siguiente:



Los trabajos realizados posteriormente demostraron que la actividad C1 estaba determinada por una β -1-4-glucancelobiohidrolasa, que actuaba precisamente sobre las cadenas generadas por la acción del componente Cx, al contrario de lo que se había planteado en un principio.

El concepto que se acepta actualmente sobre la acción de celulasas es que tanto las endoglucanasas como las exoglucanasas actúan sinérgicamente sobre celulosa. Las primeras rompen enlaces en las regiones amorfas, formando extremos no reductores sobre los que actúan las exoglucanasas liberando celobiosa y oligosacáridos de bajo Pm que son transformados en glucosa por la β -glucosidasa. Un esquema del mecanismo de acción se presenta en la figura 10 (Montenecourt y Eveleigh, 1979). De esta forma, la endoglucanasa produce puntos de ataque para la celobiohidrolasa y ésta a su vez deja al descubierto nuevas cadenas de glucano sobre cuyas regiones amorfas vuelven a actuar las endoglucanasas. El papel de la β -glucosidasa es clave al hacer desaparecer la celobiosa del medio que, de acumularse, inhibiría la actuación de las otras enzimas. El mecanismo global de acción del complejo enzimático se sigue estudiando actualmente y han aparecido nuevas hipótesis como la de Eriksson (1979) que se comentará en apartados posteriores, que parece involucrar un nuevo factor, posiblemente una enzima oxidativa, que sería responsable del comienzo de la hidrólisis de la celulosa.

1.3.1.1.3. Sinergismo entre los componentes del complejo enzimático.

El sinergismo que muestran los distintos componentes del complejo enzimático en su modo de acción y que ya se ha mencionado en el apartado anterior, es de dos tipos. En primer lugar, está el sinergismo entre endoglucanasas y exoglucanasas, una de cuyas pruebas más evidentes fue aportada por Eriksson y Pettersson (1975) que demostraron el aumento de degradación de celulosa cristalina y algodón por exo-1-4- β -glucanasa cuando habían sido tratados previamente con endo-1-4- β -glucanasa. La observación de que sobre ciertas celulosas, como la celulosa tratada con ácido fosfórico, no se detecta este tipo de fenómeno puede explicarse por el hecho de que la despolimerización provocada por dicho tratamiento ácido genera suficientes sitios activos como para que las exoglucanasas no necesiten la acción de la otra enzima.

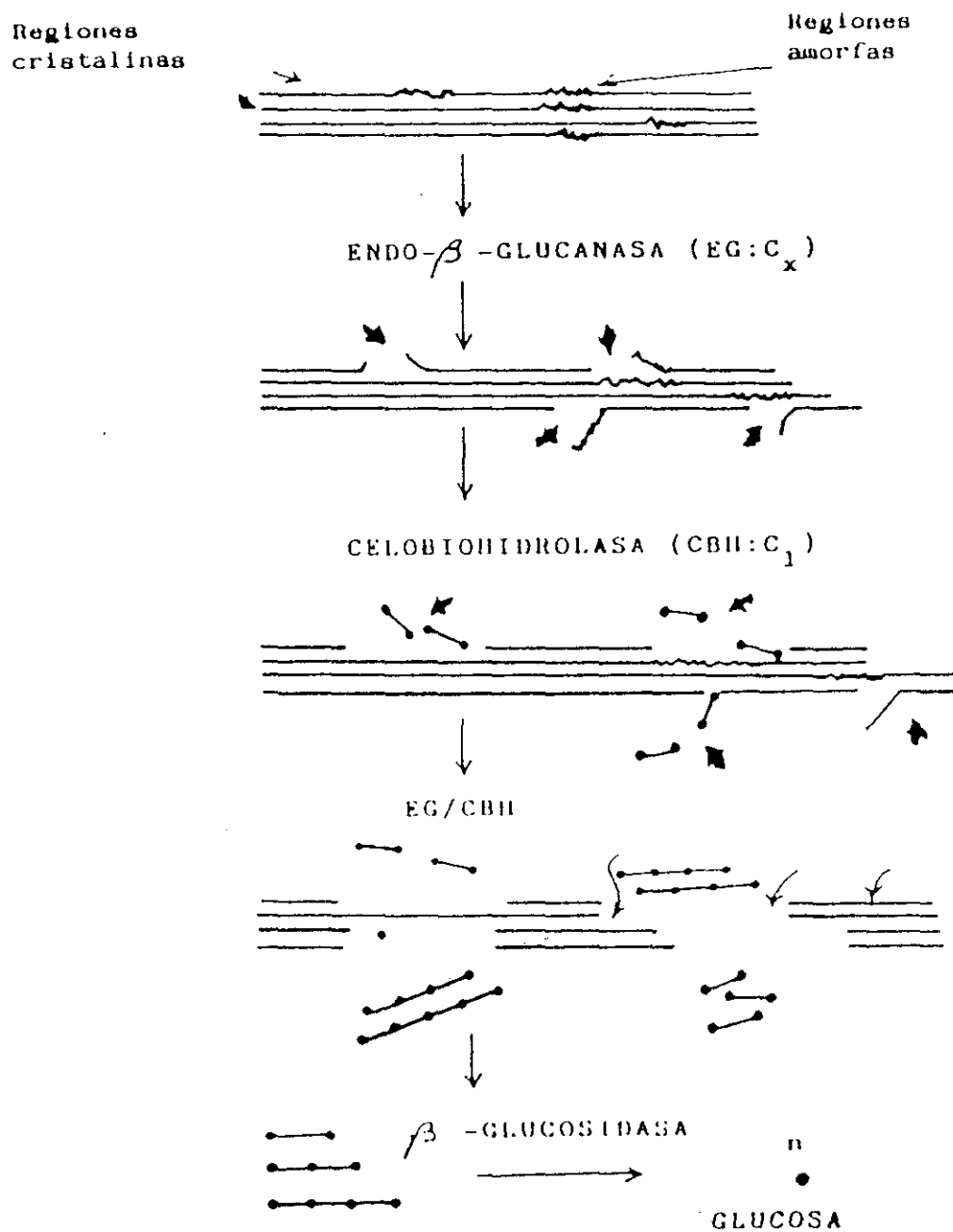


Figura 10. Esquema de la etapas secuenciales en la hidrólisis enzimática de la celulosa.

La cooperación entre endoglucanasas y exoglucanasas también se ha estudiado en experimentos cruzados en los que se ha evaluado la actividad enzimática de mezclas de los dos tipos de enzimas procedentes de microorganismos distintos en cada caso (Woodward, 1991). La adición de exoglucanasas a filtrados de endoglucanasas produce un aumento de la actividad celulolítica excepto cuando dichos filtrados proceden de organismos que, como *Myrothecium verrucaria*, no producen exoglucanasas. La ausencia de sinergismo en este caso se ha interpretado como una prueba a favor de la hipótesis de que las exoglucanasas aunque incrementan la degradación de la celulosa significativamente no son esenciales para ella. Sin embargo, la comparación entre los sistemas celulolíticos de estos dos tipos de hongos (los productores de exo y endoglucanasas y los que sólo producen estas últimas), debe hacerse con limitaciones puesto que hay evidencias de la existencia de una etapa oxidativa, como iniciadora de la hidrólisis de celulosa, en hongos no productores de exoglucanasas (Finch y Roberts, 1985).

El otro sinergismo al que se hacía referencia es el existente entre las enzimas celulolíticas propiamente dichas (exo y endoglucanasas) y las enzimas responsables de la degradación de la celobiosa que tiene un efecto fuertemente inhibitorio sobre las primeras. Estas enzimas incluyen la β -glucosidasa que hidroliza la celobiosa a glucosa y los oligómeros cortos, así como las enzimas oxidativas que transforman la celobiosa en ácido celobiónico, que a su vez puede ser hidrolizado por la β -glucosidasa a glucosa y gluconolactona.

La contribución de las enzimas oxidativas, de las que carecen muchos hongos celulolíticos y que parecen intervenir asimismo en el proceso de degradación de lignina, al sinergismo del complejo de celulasas es todavía poco conocida. Con respecto a la β -glucosidasa su efecto sinérgico es difícil de evaluar por el hecho de que tanto la glucosa como la gluconolactona, derivadas de las transformaciones de la celobiosa, son poderosos inhibidores para esta enzima. Hay una serie de factores que influyen, sin duda, en la contribución de esta enzima al sinergismo del sistema:

1. Alta velocidad máxima en comparación con las de exo y endoglucanasas.
2. Inhibición por glucosa de magnitud similar a las que experimentan exo y endoglucanasas por este mismo producto y muy inferior a la inhibición de dichas enzimas por celobiosa.
3. La reacción catalizada por dicha enzima no parece ser reversible en una tasa significativa.

1.3.1.1.4. Modelos cinéticos.

Se han realizado numerosos estudios con el objetivo de encontrar modelos cinéticos que se ajusten al proceso de hidrólisis enzimática de la celulosa. Sin embargo, la complejidad del sistema celulolítico, la propia naturaleza del sustrato, el modo de acción al azar de las endoglucanasas y la existencia de inhibición por productos finales hacen que la aproximación a modelos cinéticos satisfactorios sea bastante difícil.

Algunos autores han descrito modelos sencillos en los que se consideran sustratos solubles sobre los que se estudian individualmente los enzimas del complejo (Howell y Stuck, 1975; Ladisch y col., 1981; Fujii y Shimizu, 1986). Estos modelos aunque son de indudable valor, se apartan mucho de la realidad del proceso de hidrólisis en el que hay que tener en cuenta como factores esenciales la insolubilidad y la relativa inaccesibilidad del sustrato.

Moo-Young y col. han trabajado con modelos cinéticos mucho más complejos en los que se ha considerado la acción de los tres principales componentes del complejo (exo y endoglucanasas y β -glucosidasa) así como la inhibición por glucosa de todos ellos y por celobiosa y oligosacáridos de las dos primeros (Okazaki y Moo-Young, 1978; Fan y Lee, 1983). Estos modelos predicen que el sinergismo de exo y endoenzimas depende de la inhibición por producto, del grado de polimerización y tipo de celulosa, de la concentración de enzima para una relación endo-exo constante y del valor de dicha relación. Asumen, sin embargo, estos autores la independencia entre constantes de Michaelis, y longitud de las cadenas celulósicas, hipótesis, por otro lado cuestionada por autores como Hsu y col. (1980), Wood y McGrae (1972) que han encontrado una relación directa entre dichas constantes y la longitud de las cadenas.

El desarrollo de modelos cinéticos para la hidrólisis de la celulosa implica tener en cuenta los aspectos siguientes:

- a) la naturaleza de la enzima utilizada, que determina la actividad de cada componente de la misma.
- b) la estructura física del sustrato, como índice de cristalinidad, área superficial asequible, etc.
- c) la interacción entre la enzima y el sustrato, que incluye todos los aspectos derivados del proceso: transferencia de materia externa, difusión interna, adsorción y reacción.

Aunque complejos en sus formulaciones matemáticas, por el gran número de parámetros que se deben manejar para integrar los distintos hechos comprobados experimentalmente, en esencia, la mayoría de los modelos apoyan la idea de que la celulosa altamente cristalina es degradada por la acción cooperativa de endo y exoglucanasas y que la función del resto de los componentes del sistema celulolítico es controlar el nivel de productos de inhibición (Ryu y col., 1984; Caminal y col., 1985; Gusakov y col., 1985a, 1985b, 1987; Beldman y col., 1988; González y col., 1989).

1.3.1.2. Microorganismos productores de celulasas

Los microorganismos capaces de crecer sobre celulosa como fuente hidrocarbonada y, por lo tanto, productores del complejo celulolítico necesario para hidrolizar dicho sustrato, se encuentran distribuidos en dos grupos fundamentales: bacterias y hongos. Las enzimas

producidas por estos microorganismos son, en su mayor parte, extracelulares ya que tienen que actuar sobre un sustrato macromolecular insoluble, incapaz de penetrar en el interior de las células.

No todos los hongos y bacterias celulolíticos estudiados han resultado interesantes para la obtención de sus enzimas, ya que algunos de ellos las producen en poca cantidad o con actividad insuficiente como para producir una degradación "in vitro" de celulosa a compuestos solubles que es la finalidad de un proceso de hidrólisis enzimática. También hay organismos que, por carecer de alguna de las enzimas del complejo celulolítico, no son capaces de digerir celulosa nativa pero si celulosas parcialmente degradadas o derivados solubles. Estos microorganismos pueden tener interés para la síntesis de algunas enzimas específicas. En la tabla VII se recoge una relación de los microorganismos celulolíticos más estudiados.

1.3.1.2.1. Hongos celulolíticos.

De la gran variedad de hongos celulolíticos existentes en la naturaleza sólo unas cuantas especies han sido utilizadas por su capacidad de producción de enzimas celulolíticas, entre ellos: *Trichoderma reesei*, *T. koningii*, *T. lignorum*, *Sporotrichum pulvurulentum*, *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus wentii*, *Fusarium solani*, *Myrothecium verrucaria*. De todos ellos, el que ha tenido un papel más destacado en los estudios de transformación de materiales lignocelulósicos, por su eficiencia para producir un sistema celulolítico completo, ha sido *T. longibrachiatum* (= *T. reesei*) aislado al final de los años 40 en los laboratorios del ejército norteamericano en Natick. A partir de esta cepa salvaje, se han conseguido mutantes hiperproductores de celulasas que poseen además, en muchos casos, una alta actividad xilanásica. Algunas de las características más destacadas de estas cepas hiperproductoras se discuten más adelante. Con respecto a la β -glucosidasa, los mejores productores de esta enzima se han encontrado, sin embargo, entre especies del género *Aspergillus* (*A. niger*, *A. phoenicis* y *A. wentii*.) (Sternberg y col., 1977; Enari y col., 1981).

1.3.1.2.2. Bacterias.

Las especies bacterianas capaces de sintetizar enzimas celulolíticas se encuentran tanto entre actinomicetos como entre bacterias verdaderas (Gram + y Gram -). Algunas son aerobias tales como los actinomicetos o el género *Pseudomonas*, otras son anaerobios facultativos como *Bacillus* o *Cellulomonas* o, anaerobios estrictos tales como *Clostridium* y *Bacteroides*.

Algunas bacterias producen cantidades importantes de enzimas extracelulares, mientras que otras, aunque no las excretan crecen activamente sobre materiales celulósicos como es el caso de *Cellulomonas* que, parece producir celulasas ligadas a la membrana celular. Entre los grupos bacterianos productores de enzimas celulolíticas extracelulares, destaca el género *Clostridium*, de gran interés por su capacidad metabólica de transformar celulosa

A) HONGOS: Mesófilos	Trichoderma reesei
	T.Koningii
	T.Lignorum
	Penicillium funiculosum
	P.iriensis
	P.variable
	Aspergillus wentii
	A.niger
	A.foetidus
	A.fumigatus
Termófilos	Polyporus adustus
	P.tulipiferae
	Fusarium solani
	Fusarium lini
	Sclerotium rolfsii
	Eupenicillium javanicum
	Geotrichum candidum
	Armillariella mellea
	Schizophyllum commune
	Monilia sp.
B) BACTERIAS: Mesófilas	Chaetomium thermophile
	Humicola sp.
	Sporotrichum thermophile
	Thermoascus aurantiacus
	Talaromyces emersonii
	Cellvibro fulvus
	C.gilvus
	C.vulgarus
	Pseudomonas fluorescens
	Acetovibrio cellulolyticus
Termófilas	Streptomyces flavogrisens
	Ruminococcus sp.
	Cellulomonas sp.
	Clostridium thermocellum
C) ACTINOMICETOS:	Mesófilos Streptomyces sp.
	Termófilos Thermomonospora sp.
	Thermoactinomyce sp.

TABLA VII. Microorganismos productores de celulasas.
(Kosaric et al.,1983).

directamente en productos tales como etanol, ácido acético, acetona, butanol, etc. Sobre este género, se han centrado gran parte de los estudios de bacterias celulolíticas con el objetivo de mejorar sus rendimientos de transformación, que son bajos, debido a su limitada baja tolerancia a etanol y a la heterogeneidad de productos que se originan como consecuencia de su metabolismo (Jhonson y col., 1982; Enari, 1983; Beguin y col., 1985).

1.3.1.2.3. Mutantes.

La búsqueda de mutantes hiperproductores de celulasas ha tenido como objetivo encontrar nuevas cepas, no sometidas a los estrictos controles genéticos y bioquímicos, que afectan a la síntesis y la actividad de las enzimas, entre las que se incluyen mecanismos de inducción, represión catabólica y represión por producto final (Tabla VIII).

Enzima	Inhibición Producto final	Represor catabólico	Inductor
Celobiohidrolasa	Celobiosa	Glucosa o	Celulosa
Endoglucanasa	Celobiosa	metabolitos	Sefarosa
Celobiasa	Glucosa	de la glucosa	Celobiosa

TABLA VIII: Mecanismo bioquímico del control de la síntesis de celulasas en *T.reesei*.

A partir de la cepa salvaje de *T.reesei* QM6a, aislada en los laboratorios de Natick, y del mutante QM9414, obtenido a partir de ella por tratamiento en acelerador lineal, se han ido obteniendo distintas series de mutantes hiperproductores que se recogen en el esquema de la figura 11. Aunque algunos de ellos, como el Rut-C-30, producen hasta 20 veces más proteínas extracelulares que las cepas originales, se siguen buscando organismos más eficientes con objeto de abaratar la fase de obtención de enzimas, que constituye, en términos económicos, alrededor del 60% del coste global de un proceso de hidrólisis enzimática (Nevalainen y col., 1980; Bisaria y Ghose, 1981; Bailey y Nevalainen, 1981; Labudová y col., 1981; Tanguy y col., 1981; Ghosh, T.K. y col., 1982; Mandels, 1982; Mishra y col., 1982; Enari, 1983; Montenecourt, 1983). En la tabla IX se comparan las actividades producidas por distintos microorganismos celulolíticos y mutantes obtenidos a partir de ellos.

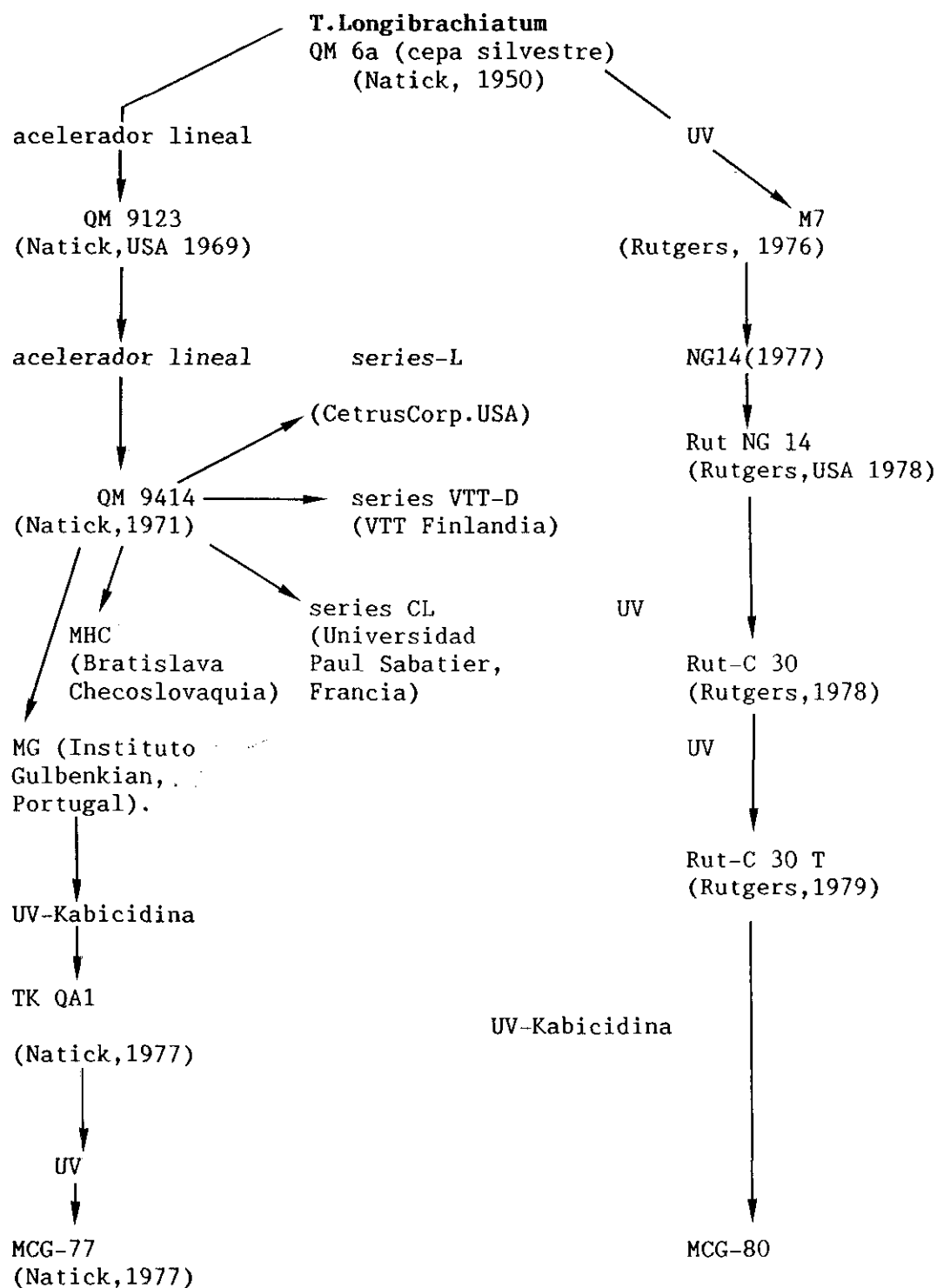


Figura 11: Genealogía de los mutantes hiperproductores de celulasas.

En los últimos años, se han realizado nuevos estudios en el campo de la

Organismo	Celobiohidrolasa (UI/ml x10 ⁻³)	Endoglucanasa (IU/ml)	Celobiasa (UI/ml)	Actividad PF (UI/ml)
<i>Pestalotiopsis</i> <i>westerdijkii</i> QM38	2,93	50	–	0,15
<i>Penicillium</i> <i>iriensis</i> QM 9624	11,58	81	–	0,77
<i>Trichoderma</i> <i>reesei</i> QM 6a	18,91	59	0,3	0,55
<i>T.reesei</i> QM 9123	29,26	96	–	1,68
<i>Sclerotium</i> <i>rolfsii</i> CMC 142	–	200	11	1,4
<i>S.rolfsii</i> UV-8	–	190	18	2,0
<i>T.reesei</i> QM 9414	57,0	110	0,5	9,5
<i>T.reesei</i> MCG-77	60,8	100	0,9	10,5
<i>T.reesei</i> NG-14	58,9	135	1,35	14,6
<i>T.reesei</i> C-30	–	150	0,3	14,0

TABLA IX: Actividades enzimáticas obtenidas en cultivos de diferentes cepas de microorganismos celulolíticos. (Kosaric et al., 1983).

ingeniería genética con el objetivo de clonar genes de celulasas en organismos de rápida división (Montenecourt, 1983; Shoemaker y col., 1983; Teeri y col., 1983; Collmer y Wilson, 1983; Wilson y Walker, 1991). Los principales obstáculos encontrados en este caso han sido, por un lado, la dificultad de clonación directa de genes de un organismo eucariota en bacterias y por otro, el hecho de que las celulasas producidas por *T.reesei* son glicoproteínas y *E.coli*, el microorganismo utilizado tradicionalmente en ensayos de clonación, carece del sistema bioquímico de glicosilación de proteínas. No obstante existe tanto interés por la genética que en la actualidad hay muchos grupos de investigación trabajando en este tema. Recientemente se ha conocido la estructura del centro activo de la celobiohidrolasa II. Esta enzima está formada por 477 aminoácidos y su centro activo está situado entre el aminoácido 175 y el 184, lo que aumenta la posibilidad de disminuir el tamaño de la enzima al

permitir eliminar los aminoácidos no esenciales para la actividad aumentando, de esta forma, la penetración de la enzima en la compleja estructura de la celulosa (Genencor, 1989). Mediante el empleo de avanzadas técnicas de ingeniería genética, parece confirmarse la posibilidad de expresión de dichos genes en levaduras, lo cual, supondría la ventaja adicional de poder reunir en un mismo microorganismo, la facultad de hidrolizar celulosa a glucosa y de fermentar la glucosa hasta etanol (Van Arsdell y col., 1987; Love y Streiff, 1987 ; Honda y col., 1987). La actividad en este área de investigación ha sido tan grande en los últimos diez años que en 1989 existen más de 30 diferentes genes de celulasas aislados (Glick y Pasternak, 1989). Se esperan grandes avances en los próximos años.

En la actualidad, las enzimas utilizadas en los procesos de hidrólisis enzimática son obtenidas de cultivos en estado sólido o sumergidos de mutantes de *T.reesei* (Esterbauer y col., 1991). Algunas de ellas se producen a escala industrial y se encuentran en el mercado mientras que otras son producidas específicamente para los procesos en que son utilizadas.

1.3.1.3. Inductores y sustratos.

Aunque la naturaleza del inductor real de la síntesis del complejo celulolítico no se conoce con exactitud, se sabe que tanto la celulosa como la celobiosa y la lactosa actúan como inductores naturales eficaces de la misma. En el caso de la celulosa, puesto que ésta es insoluble, cabría pensar que el verdadero inductor debería ser algún compuesto soluble, derivado de su metabolismo. Además de la glucosa, la celobiosa es el producto principal formado en la degradación de la celulosa. La glucosa y otras fuentes de carbono fácilmente metabolizables, actúan como represores de la síntesis de endoglucanasas y celobiohidrolasas hasta tal punto que, en el caso de *T.reesei*, aunque éste crece muy bien en medios glucosados, no sintetiza enzimas celulolíticos, hasta que no ha desaparecido completamente la glucosa de los mismos. La celobiosa, sin embargo, se ha mostrado en diversos experimentos realizados como un eficaz inductor de la síntesis de celulasas. Utilizando celobiosa como inductor y única fuente de carbono, se han conseguido producciones de enzimas tan altas como las obtenidas con celulosa (Enari, 1983), siempre que la concentración de celobiosa en el medio se mantenga baja. Para algunos hongos como *T.reesei*, se ha demostrado la existencia de una síntesis basal de celulasas independiente de la fuente de carbono que sería responsable de una degradación preliminar de celulosa a celobiosa que actuaría como inductor del complejo.

La lactosa, aunque no se conoce su mecanismo de inducción, se sabe que actúa como un inductor de la síntesis del complejo celulolítico a bajas concentraciones (Gong y Tsao, 1979). A diferencia de lo que ocurre en el caso de la celobiosa, parece que altas concentraciones de este disacárido no inhiben el proceso de síntesis. Algunos mutantes de *T.reesei* son capaces de sintetizar activamente celulasas cuando crecen sobre lactosa como inductor y única fuente de carbono (Dury y col., 1984). En este caso, la glucosa y la galactosa actúan como catabolitos reguladores de la producción de enzimas.

Asimismo, se ha observado el efecto inhibitorio de bajas concentraciones de sefarosa, disacárido que se encuentra presente en algunas preparaciones industriales de glucosa que estimulan la síntesis de enzimas celulolíticas. No se sabe con exactitud si la sefarosa es un inductor natural en cultivos de *T. reesei* sobre celulosa, aunque el hecho de que este microorganismo posea actividades de transglicosilación, necesarias para la síntesis de sefarosa, apoya esta posibilidad. Al igual que en el caso de celobiosa, la inducción por sefarosa es dependiente de la concentración, produciéndose una inhibición de la síntesis de enzimas cuando la proporción del disacárido en el medio es elevada (Nisizawa y col., 1971; Sternberg y Mandels, 1979; Loewenberg, 1984; Mishra y Gopalkrishnam, 1984; Kawamori y col., 1986).

Con respecto a la β -glucosidasa y como ya se comentó anteriormente, esta enzima es producida por todos los organismos celulolíticos pero también por algunos que carecen de celobiohidrolasas. Parece ser que existe una β -glucosidasa constitutiva, intracelular muy resistente a represión catabólica, mientras que la β -glucosidasa extracelular es reprimida por glucosa e inducida por muchos β -glucósidos como metil- β -D-glucósido, salicina y celobiosa. La celobiosa no actúa como inductor de esta enzima.

1.3.2. Pretratamientos de los materiales lignocelulósicos.

Uno de los factores que contribuyen más decisivamente a limitar el rendimiento de un proceso de hidrólisis enzimática de celulosa es la propia estructura de este compuesto. La asociación de la celulosa con lignina, que constituye una auténtica barrera física a la penetración de las enzimas celolíticas, unida a la cristalinidad de las moléculas de celulosa, dificultan en tal grado la acción de las enzimas que se hace necesario alterar previamente mediante tratamientos diversos las características de dicha estructura.

Hay otros factores, tales como el grado de polimerización (DP) y de sustitución de las cadenas celulósicas, contenido en humedad y madurez de la fibra y la asociación con otras sustancias que también modifican la susceptibilidad de un sustrato celulósico a la acción enzimática. Como objetivos fundamentales de los pretratamientos de materiales lignocelulósicos destinados a modificar sus características para favorecer el rendimiento de la hidrólisis posterior, podrían enumerarse los siguientes:

- # reducir la cristalinidad de la celulosa.
- # disociar el complejo lignina-celulosa.
- # aumentar el área superficial de la fibra de celulosa.
- # disminuir en la medida de lo posible la presencia de aquellas sustancias que dificulten dicho proceso.

Un pretratamiento eficaz debería, además, reunir otras características tales como: bajo consumo energético, bajos costes de inversión y mantenimiento, utilización de reactivos baratos y fácilmente recuperables, y posibilidad de aplicación a diversos sustratos. Existen numerosos pretratamientos de materiales lignocelulósicos descritos en la bibliografía especializada (Fan y col., 1982; Gharpuray y col., 1983; Ghose y col., 1983; Puri y Mamers, 1983; Martin y col., 1985; Vallander y Eriksson, 1985) y algunos de ellos son muy eficaces con respecto al incremento del rendimiento de hidrólisis enzimática. Sin embargo, no todos son aplicables a escala industrial debido a los altos costes o las dificultades técnicas que conllevan. En la tabla X, se relacionan distintos métodos de pretratamiento utilizados para aumentar la digestibilidad de los materiales lignocelulósicos.

Por su naturaleza, los pretratamientos se clasifican en tres grupos generales: químicos, físicos y biológicos. La evaluación de la efectividad de los mismos se hace en base al rendimiento de hidrólisis posterior del material pretratado, en función del cual se determinan experimentalmente las condiciones óptimas de operación en cada caso. A continuación, se describen brevemente dentro de los tres grupos citados algunos de los pretratamientos más estudiados.

FÍSICOS**QUÍMICOS****BIOLÓGICOS****Molienda**

molino de bolas
molino de doble
 rodillo
molino de martillos
molino coloidal

Vapor a alta presión

Extrusión

Expansión

Pirólisis

Radiación de alta energía

Alcalis

Hidróxido sodico
amoníaco
sulfito amónico

Acidos

ac.sulfúrico
ac. clorhídrico.
ac.fosfórico

Gases

dióxido de cloro
dióxido de nitrógeno
dióxido de azufre

Agentes oxidantes

peróxido de hidrógeno
ozono

Disolventes de celulosa

Cadoxen
CMCS

Organosolventes

extracción:
etanol:agua
benceno:etanol
etilenglicol
butanol:agua

Agentes de "swelling"

TABLA X: Métodos utilizados para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos.

1.3.2.1. Pretratamientos físicos.

Los pretratamientos físicos se suelen dividir en dos categorías: mecánicos y no mecánicos. En los primeros, se utilizan las fuerzas de impacto y cizalladura que conducen a materiales de baja cristalinidad, mayor superficie específica y densidad aparente más alta. Como consecuencia, se facilita la hidrólisis posterior, se disminuye el volumen del reactor y se abarata el transporte de materiales. Entre estos pretratamientos cabe mencionar diferentes tipos de moliendas (molino de bolas, martillos, cuchillas, rodillo) así como procesos de molienda e hidrólisis simultánea (Furcht y Sille, 1990). Los pretratamientos de carácter físico no mecánico someten al residuo celulósico a la acción de agentes externos que provocan alteraciones diversas del material de partida. Entre estos, se encuentran los tratamientos con radiación, la utilización de vapor a altas presiones y la pirólisis a temperaturas intermedias.

Molienda y trituración.

En general, los pretratamientos por molienda (que pueden efectuarse tanto por vía seca como por vía húmeda) tienen el inconveniente de su alto consumo energético. Aunque es necesario triturar el material lignocelulósico previamente hasta un cierto tamaño para facilitar su manejo posterior, el planteamiento de una operación de molienda intensivo como pretratamiento principal de un sustrato se considera poco recomendable para la economía del proceso.

Radiación de alta energía.

En cuanto al pretratamiento por irradiación, de eficiencia comprobada en algunos casos (Kumakura y Kaetsu, 1982; Kumakura y col., 1982; Kumakura y Kaetsu, 1983; Kumakura y Kaetsu, 1984; Khan y col., 1986), además de su alto coste, es técnicamente difícil de llevar a la práctica debido a que la baja densidad de los materiales lignocelulósicos y las altas dosis requeridas obligarían al diseño de instalaciones demasiado complejas. Puesto que en este trabajo se estudia el efecto de la radiación gamma sobre el rendimiento de hidrólisis enzimática se discutirán, en posteriores apartados, aspectos concretos de este pretratamiento.

Explosión por vapor.

El pretratamiento con vapor a alta presión (steam-explosion) combina los efectos, sobre el material lignocelulósico, de altas presiones y temperaturas junto con la descompresión brusca posterior (Jusarek, 1979; Saddler y col., 1982; Marchessault y col., 1983; Puls y col., 1983, Schultz y col., 1983). Este pretratamiento que se basa en el proceso Mansonite,

de aplicación muy extendida en la industria papelera, también puede realizarse en presencia de determinados agentes químicos, ácidos y bases. El resultado final es la obtención de un producto fibroso cuya fracción celulósica es mucho más accesible al ataque enzimático. La hemicelulosa que se despolimeriza en mayor o menor medida dependiendo de las condiciones del pretratamiento es fácilmente recuperable por simples lavados, y la lignina, prácticamente inalterada, puede ser extraída y utilizada con fines diversos.

Para la aplicación de este pretratamiento se han desarrollado algunos procesos comerciales en continuo y discontinuo cuyo objetivo es aumentar la digestibilidad de residuos lignocelulósicos para su utilización como alimento de ganado o incrementar su rendimiento en procesos de hidrólisis. Los aspectos concretos del tratamiento con vapor a altas presiones se discutirán más adelante junto, con los resultados obtenidos en este trabajo, para el caso concreto de su aplicación a la hidrólisis enzimática de *O.nervosum*.

1.3.2.2. Pretratamientos químicos.

El objetivo fundamental de estos pretratamientos es, en general, solubilizar la fracción de lignina y modificar la estructura de las cadenas celulósicas de manera que sean fácilmente atacables por las enzimas. Existen procesos de deslignificación de fibras empleados tradicionalmente en la industria papelera, que a pesar de su gran eficacia para eliminar lignina no son de gran utilidad como pretratamiento por estar diseñados para respetar al máximo la estructura de la celulosa. Entre los pretratamientos químicos más estudiados se encuentran los tratamientos con álcalis, ácidos, organosolventes y agentes oxidantes.

Aún para los más eficaces pretratamientos químicos, hay que reconocer la existencia de inconvenientes que plantean serios problemas a la hora de ponerlos en práctica a gran escala. Entre ellos, la necesidad de disponer de equipos fabricados con materiales especiales resistentes a la corrosión, la exigencia de efectuar lavados sucesivos del sustrato pretratado y la producción de residuos químicos contaminantes que hay que procesar y eliminar de alguna manera.

Los mecanismos de acción de los agentes químicos sobre el material lignocelulósico son de varios tipos. Algunos actúan solubilizando determinadas fracciones, tal como es el caso de los tratamientos con solventes orgánicos (etanol, butanol, etilenglicol, etc) que extraen la fracción de lignina y que han sido fundamentalmente utilizados en los procesos de elaboración de pulpa de papel, o la solubilización de hemicelulosa con bajas concentraciones de ácido habitualmente empleado como fase previa a la hidrólisis ácida de celulosa. La mayor parte de los pretratamientos químicos empleados persiguen sin embargo la ruptura de los enlaces de hidrógeno en las regiones cristalinas de la fibra con objeto de abrir la estructura y permitir el paso de los agentes hidrolíticos. En este grupo hay que incluir la utilización de ácidos (H_2SO_4 , H_3PO_4), sales ($ZnCl_2$), álcalis ($NaOH$, NH_3 , $Ca(OH)_2$ etc.).

De todos estos pretratamientos, uno de los que han proporcionado mejores resultados es el tratamiento con NaOH tradicionalmente empleado para aumentar la digestibilidad de la paja para alimentación animal. El tratamiento con NH₃ aunque menos efectivo que el anterior también es interesante, sobre todo en el caso de residuos para alimento de ganado puesto que produce un aumento del contenido en N₂ orgánico del sustrato como consecuencia de la formación de acetato amónico.

El resto de los pretratamientos químicos o bien producen resultados menos satisfactorios o son excesivamente caros por la tecnología o los reactivos que hay que emplear (por ejemplo solventes orgánicos) o incluso plantean problemas de toxicidad, como ocurre con el cadoxen (solución alcalina de etilendiamina) que actúa como disolvente de la celulosa y que produce un aumento del rendimiento de hidrólisis muy significativo.

Puesto que las condiciones del tratamiento y los resultados dependen en gran medida del tipo de sustrato utilizado, en este trabajo se han estudiado algunos de los pretratamientos químicos anteriormente mencionados con objeto de comparar el efecto de todos ellos sobre un mismo material. Los resultados obtenidos en cada caso se recogen en el apartado correspondiente de esta memoria.

1.3.2.3. Pretratamientos biológicos.

Estos pretratamientos consisten en someter a la biomasa lignocelulósica a la acción de microorganismos degradadores de lignina y hemicelulosa con lo que se destruyen así las estructuras que protegen a la celulosa y se la hace más accesible al ataque hidrolítico. Un problema que presentan un gran número de los mencionados microorganismos es que poseen también actividad celulolítica, consumiendo la celulosa preferentemente a la lignina. Son numerosos los trabajos que tratan sobre el tema de la biodegradación de la lignina (Kirk y col., 1986; Kadam y Drew, 1986; Sanglard y col., 1986; Botany y col., 1987) y son interesantes las investigaciones que en este campo se están realizando para conseguir el denominado "biopulping", nuevo proceso de fabricación de papel en el que la celulosa es liberada de la lignina por medio de microorganismos ligninolíticos y no mediante procesos químicos tradicionales.

1.3.3. Procesos de hidrólisis enzimática.

De acuerdo con el esquema general de un proceso de hidrólisis enzimática, el sustrato una vez sometido al pretratamiento, seleccionado de acuerdo con sus características específicas, es hidrolizado, mediante la acción de las enzimas celulolíticas, hasta glucosa. Las condiciones del proceso, temperatura, tiempo de hidrólisis, concentración de enzimas y

relación sólido-líquido dependen del sustrato elegido y de las características y actividad hidrolítica del complejo utilizado y deben por tanto ser determinadas experimentalmente para cada caso concreto.

Estos parámetros unidos a la finalidad del proceso de hidrólisis de que se trate determinan el modo de operación más adecuado en cada caso. Se han descrito numerosos sistemas para llevar a cabo los procesos de hidrólisis enzimática: continuos, discontinuos, con enzimas inmovilizadas, con reciclado de enzimas, con fermentación simultánea, biorreactores de membrana, etc., cada uno de los cuales presenta ventajas e inconvenientes que se discutirán mas adelante junto con la descripción de dichos esquemas operativos. Las dificultades para realizar a gran escala estos procesos no son sólo de orden técnico sino económico, ya que los productos resultantes deben competir, entre otros, con los derivados de la industria petroquímica cuyos precios son en la actualidad, inferiores a los que alcanzaron durante la crisis energética y que generaron unas perspectivas para la transformación de celulosa muy optimistas. Con el conflicto político del Golfo Pérsico, se ha vuelto a considerar la necesidad de una mayor dedicación de recursos en la búsqueda de soluciones alternativas al petróleo.

Los factores que influyen en mayor medida en el coste de la hidrólisis con enzimas son la baja actividad específica de las mismas y la fuerte inhibición que experimentan por acumulación de los productos finales, fundamentalmente celobiosa y glucosa. Es por esto, por lo que las variaciones más importantes, diseñadas sobre el esquema básico del proceso, han tenido como objetivo la reducción o eliminación de estos factores negativos. En esencia, se ha tratado de recuperar y reutilizar las enzimas en operaciones sucesivas y eliminar el efecto de los productos de hidrólisis separándolos del medio o transformándolos mediante fermentaciones simultáneas, acopladas o empleo de cocultivos.

1.3.3.1. Recuperación e inmovilización de enzimas.

La inmovilización de enzimas, que es una técnica ampliamente utilizada en los modernos procesos biotecnológicos, presenta, en el caso concreto de las celulasas, muchos inconvenientes debido a la insolubilidad del sustrato que dificulta enormemente la interacción de éste con los enzimas inmovilizadas. A pesar de esto, se han descrito algunos trabajos experimentales de inmovilización de celulasas con buen resultado en cuanto a retención de la actividad y reutilización de los lechos enzimáticos (Woodward y col., 1982; Fadda y col., 1984; Lobarzewski y Paszczynski, 1985; Wongkhalaung y col., 1985; Fujikawa y col., 1988; Lee y Woodward, 1983) y utilizando como soportes para la inmovilización: sefarosa, dextranos activados, esferas de vidrio, etc. Esta técnica no ha pasado, sin embargo, de la etapa de laboratorio y aunque no parece muy viable para el caso de celulasas no se descarta la posibilidad de su utilización para transformación de materiales lignocelulósicos sobre todo en el caso de la β -glucosidasa en cuyo caso no presenta la limitación de la insolubilidad del sustrato.

Otra forma de disminuir el gasto de enzimas sería la de recuperar éstas de los hidrolizados mediante ultrafiltración o adsorción sobre sustratos frescos. El inconveniente de estas técnicas es que gran parte de las enzimas utilizadas, sobre todo exo y endoglucanasas, permanecen adsorbidas al sustrato residual con lo que el complejo recuperado va desequilibrándose con respecto a su composición original (Peitersen, 1975; Lee y col., 1982; Ooshima y col., 1990) complicando el diseño de un proceso de este tipo.

1.3.3.2. Separación de productos de hidrólisis.

La separación de los productos de hidrólisis tiene por objetivo, como hemos dicho anteriormente, eliminar o reducir la inhibición que sobre la acción enzimática ejercen dichos productos, fundamentalmente glucosa y celobiosa y, que puede en último término detener el proceso de hidrólisis.

Actualmente se están estudiando diversos sistemas que permitirían retirar estos productos a medida que se generan. Entre ellos, están los reactores de membrana de ultrafiltración, que son reactores convencionales equipados con una membrana de poro adecuado para que las enzimas puedan ser retenidas mientras que el hidrolizado es retirado y sustituido por medio fresco (Ghose y Kostick, 1970; Grianfreda y Greco, 1980; Alfani y col., 1983; Ohlson y col., 1984). Este es, en realidad, un sistema de ultrafiltración que tiene el inconveniente de producir medios con muy baja concentración de azúcares y por tanto un incremento económico y energético del proceso global al tener que ser concentrados para posteriores operaciones.

Otros sistemas que permiten el reciclado de las enzimas y la separación de los productos de hidrólisis son los sistemas acuosos de doble fase (Tjerneld y col., 1985a; 1985b; 1991). Las dos fases de estos sistemas se forman con polímeros solubles como dextranos y polietilenglicol que son biocompatibles por su alto contenido en agua. Los azúcares formados durante la etapa de hidrólisis se distribuyen en una de las fases, de donde pueden ser separados mediante un sistema de ultrafiltración o ser fermentados directamente, mientras que las enzimas y el sustrato se distribuyen en la otra. Según una comparación recogida en la bibliografía (Tjerneld y col., 1985b) el grado de utilización de enzimas (expresado como actividad enzimática, en unidades de papel de filtro consumidas por gramo de azúcares reductores formados) es de 35 para un proceso discontinuo clásico, 9,6 para un sistema de ultrafiltración y 16,6, para un sistema acuoso de dos fases, aunque este último permite obtener soluciones de azúcares más concentradas (5-7%) que las obtenidas en reactores de ultrafiltración (1%).

1.3.3.3. Procesos de sacarificación y fermentación simultánea y acoplada.

La acumulación de glucosa y otros azúcares en el medio de hidrólisis también puede evitarse utilizando procesos de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) en los cuales los azúcares, producidos por la acción de las celulasas sobre el material celulósico, son, simultáneamente, transformados en etanol mediante levaduras o bacterias, fundamentalmente *Saccharomyces* o *Zymomonas* (Viikari y col., 1981; Ghosh y col., 1982; Asenjo y Jew, 1983; Deshpande y col., 1983; Kosaric y col., 1983; Ghose y col., 1984; Spangler y Emert, 1986; Wright y col., 1987; Spindler y col., 1989; Szczodrak, 1989). Empleando levaduras como *Candida vickerhamii*, que no sólo transforma en etanol la glucosa sino que también es capaz de utilizar celobiosa y celodextrinas, se podría, incluso, reducir la limitación del rendimiento final de transformación originado por la baja actividad que, en general, presenta la β -glucosidasa de la mayoría de los complejos celulolíticos (Freer y Wing, 1985).

El principal inconveniente de este tipo de procesos radica en las diferentes condiciones, sobre todo de temperatura, que requieren las dos fases que lo constituyen. Habría que establecer soluciones de compromiso para las distintas variables de operación, así, la temperatura podría mantenerse alrededor de unos 40°C, que es un valor intermedio entre la temperatura óptima para la actuación de celulasas (40-50°C) y la correspondiente a las levaduras (30-35°C). Este problema se podría, también, solventar con la utilización de microorganismos fermentativos termotolerantes, que aportarían la ventaja, al trabajar a altas temperaturas, de facilitar el proceso de destilación del etanol y disminuir su coste. Con el proceso SFS se elimina, además, la necesidad de utilizar reactores separados, reduciéndose por tanto el coste de instalación y operación (Blanco y col., 1982).

Entre los procesos de SFS descritos, cabe destacar el proceso de la Gulf Oil Corporation realizado con celulasas de *Trichoderma reesei* QM 9414 y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sk1 utilizando solka-floc BW200 (Kosaric y col., 1983). Asimismo Szczodrak (1988) ha estudiado el proceso de SFS utilizando celulasas de *T.reesei* junto con *Kluyveromyces fragilis* sobre paja de trigo sometido a diferentes pretratamientos, consiguiendo productividades muy superiores a las obtenidas al realizar ambos procesos por separado. Sin embargo el proceso de SFS más importante en la actualidad es el patrocinado por el Departamento de Energía de EE.UU. (DOE) y realizado en el Solar Energy Research Institute (SERI) de Colorado (Wyman, 1990).

Este proceso SFS está integrado en un gran proyecto de producción de etanol a partir de cultivos energéticos (herbáceos y leñosos) cuyo objetivo es la obtención de etanol a un precio competitivo con el de la gasolina para utilizarlo como combustible en automoción en EE.UU.

Este proyecto comenzó en 1980 y sus objetivos principales son obtener unas materias primas muy baratas (altas productividades de los cultivos energéticos), mejorar el proceso de hidrólisis y fermentación (enzimas y levaduras) y aprovechar íntegramente los

productos mayoritarios de la biomasa (hemicelulosa, celulosa y lignina). En este proceso se utiliza un pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, aunque también se estudia el tratamiento con organosolventes. El complejo enzimático lo obtiene la empresa Genencor del *T.reesei*, pero continúan trabajando en producción de enzimas procedentes de hongos (con fermentadores de lecho fluidizado) y de bacterias productoras de celulasas termoresistentes (*Acidothermus cellulolyticus*).

La fermentación se realiza con la intervención del *S.cerevisiae* (fermenta la glucosa) y del *Brettanomyces clausenii* que fermenta la celobiosa producida en la hidrólisis de la celulosa, solucionando, de esta forma, los problemas de inhibición por producto final de las enzimas endo y exoglucanasas.

El problema de la fermentación de la xilosa derivada de la fracción de hemicelulosa lo están resolviendo en un proceso simultáneo, utilizando la enzima isomerasa inmovilizada (cataliza la conversión de xilosa a xilulosa), obtenida por manipulación genética del *E.coli* y levaduras.

El aprovechamiento de la lignina lo están estudiando a través de procesos termoquímicos para la producción de metil-aril-éteres (MAE), compuestos que incrementan el octanaje de las gasolinas sin incrementar la presión de vapor de las mezclas.

El esquema del proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica propuesto por el SERI está representado en la figura 12.

Fruto del esfuerzo realizado por el DOE en estos diez años (1980-1990) es el hecho de que el precio del etanol estimado se ha reducido desde 3,60 \$/galón en 1980 a 1,35 \$/galón en 1989. Sin embargo, el objetivo del Programa es una reducción de costes hasta 0,6 \$/galón (aproximadamente 20 pts/l a valor actual del \$=100 pts) basados fundamentalmente en mejoras tecnológicas de las distintas etapas del proceso que incluyen en todos los casos los avances científicos que se prevén pueden realizarse a corto y medio plazo (Wyman, 1990).

La sacarificación y fermentación simultánea también se puede llevar a cabo utilizando microorganismos con capacidad para realizar ambas funciones. En este sentido, además de los intentos de expresar los genes de celulasas en levaduras, también se llevan a cabo estudios genéticos con microorganismos que, aunque con bajos rendimientos, pueden transformar celulosa en etanol directamente. Este es el caso de *Clostridium thermocellum* que es un organismo altamente celulolítico que fermenta celulosa y los productos de degradación, fundamentalmente glucosa y celobiosa, produciendo etanol, CO₂ y ácidos orgánicos. El género *Monilia* también puede utilizarse en estos procesos ya que además de celulosa puede utilizar hemicelulosa y sustancias pécticas como fuente de carbono (Gong y col., 1981). La

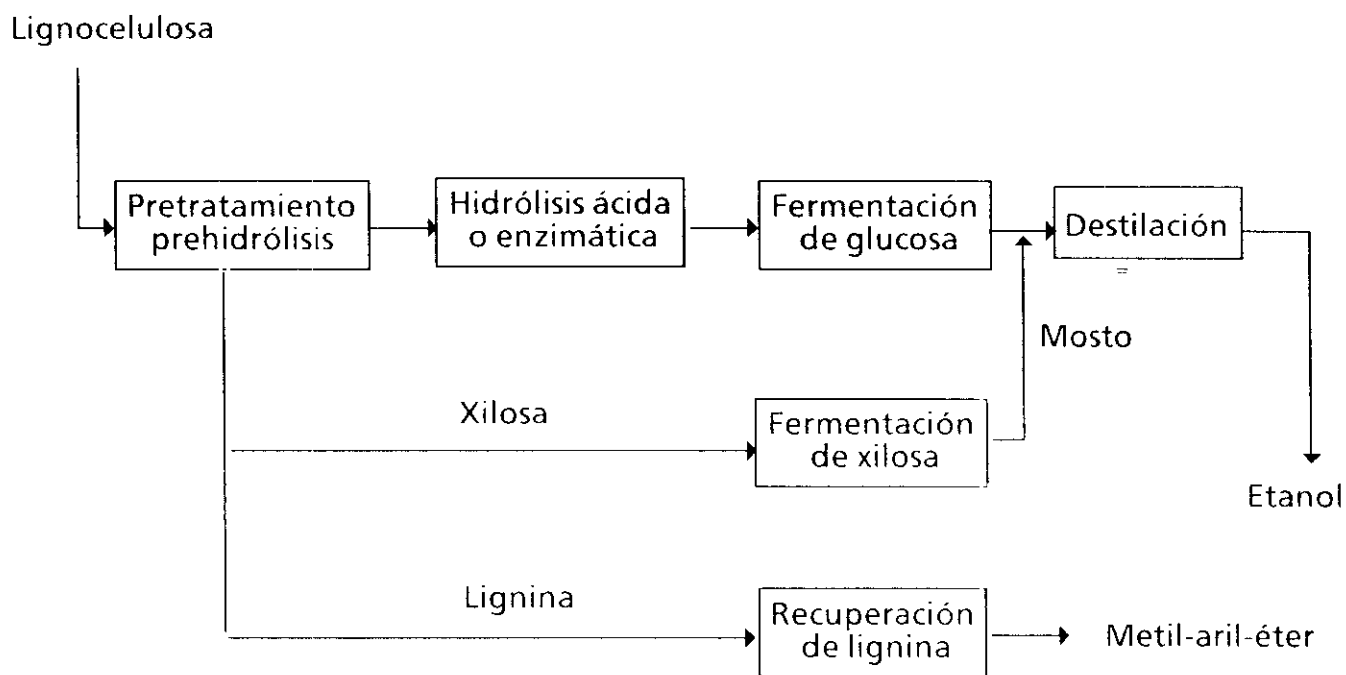


Figura 12. Proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica (Wright 1987)

principal limitación de este tipo de microorganismos es que debido a la heterogeneidad de su metabolismo producen un rendimiento bajo de transformación y en el caso de *Clostridium* existe el problema adicional de la inhibición de su metabolismo por la acumulación de etanol incluso a bajas concentraciones.

Los principales procesos que emplean microorganismos con capacidad de sacarificación y fermentación son: MIT, GE/CRA y PEN/Arkansas.

1.3.3.4. Utilización de cocultivos.

La obtención de etanol a partir de materiales celulósicos ha sido, asimismo, abordada utilizando cocultivos de organismos con capacidad celulolítica y fermentativa, evitando de esta forma la fase de producción y obtención de enzimas. Este tipo de procesos se ha estudiado ampliamente con bacterias termofilicas del género *Clostridium* como *Cl. thermocellum*, *Cl. thermosaccharolyticum* y *Cl. thermohydrosulfuricum*. El primero de ellos es un organismo altamente celulolítico que fermenta la celulosa y sus productos de degradación, fundamentalmente celobiosa y glucosa, produciendo etanol, CO₂ y ácidos orgánicos. Puesto que esta bacteria es capaz de degradar hemicelulosas pero no de fermentar las pentosas producidas, su cultivo con cualquiera de las otras dos especies aumenta significativamente el rendimiento en etanol, ya que estas últimas son capaces de utilizar tanto las pentosas como la glucosa y la celobiosa producidas por la primera (Gomez, 1982; Ng y Zeikus, 1982). También se han obtenido buenos resultados utilizando cocultivos de *Cl. thermocellum* con bacterias productoras de etanol como *Zymomonas mobilis* (Kosaric y col., 1983).

Como inconvenientes principales de los cocultivos hay que señalar la dificultad de controlar y mantener un proceso en el que deben coexistir poblaciones microbianas diferentes y cuyas exigencias pueden ser en algunos casos difíciles de hacer compatibles.

De lo anteriormente expuesto, se puede concluir que no hay un proceso de eficacia demostrada para llevar a cabo la etapa de hidrólisis, pero sí hay diferentes opciones sobre las que se puede trabajar en cada caso concreto (tipo de sustrato, tipo de enzima, productos que se quieren obtener, etc), para conseguir buenos resultados. La puesta en práctica de estos procesos depende no sólo de la resolución de las cuestiones técnicas que se plantean sino también de factores económicos tales como competencia de los productos obtenidos a partir de la celulosa con los obtenidos por otras vías, precio del petróleo, y por tanto de los productos derivados de la petroquímica, etc. que son variables y por tanto difíciles de evaluar.

No obstante, y por los datos económicos y técnicos recogidos en la bibliografía y parcialmente expuestos anteriormente, parece recomendable profundizar en el estudio del proceso de SFS, así como en la determinación del pretratamiento más adecuado para la biomasa seleccionada según los criterios expuestos. El hecho de que organismos tan impor-

tantes como el DOE y el SERI apoyen y estudien ese proceso como medio para producir etanol y solventar así sus problemas de obtención de combustibles líquidos, nos animó a emprender esta tesis con la que modestamente podemos contribuir en nuestro país a obtener energía (en forma de combustible líquido) y materias primas que ayuden al ahorro de petróleo.

2. OBJETO E INTERES DEL TEMA

2. OBJETO E INTERES DEL TEMA.

En el presente trabajo se estudia la hidrólisis enzimática de la celulosa de *Onopordum nervosum* boiss utilizando un complejo enzimático obtenido a partir de *Trichoderma reesei* QM9414.

La disminución de las reservas de combustibles fósiles y el aumento del precio de los mismos ha concentrado durante los últimos años mucha atención en la investigación y desarrollo de nuevas fuentes de energía y materias primas. La celulosa, por su abundancia y su capacidad de ser renovada continuamente en la naturaleza, ha sido, de entre dichas fuentes, una de las más estudiadas. Para su utilización, pueden aplicarse diversos procesos de transformación en función de la finalidad concreta que se persiga. Entre estos procesos, uno de los más prometedores es la hidrólisis mediante enzimas, para su conversión en glucosa, que puede ser empleada directamente para alimentación humana y animal o como sustrato de transformaciones para obtener SCP, combustibles o compuestos químicos diversos.

En este contexto y teniendo en cuenta las perspectivas que presenta *O. nevosum* (cardo silvestre) para su introducción en algunas zonas de España como cultivo alternativo productor de lignocelulosa, se ha considerado el interés de realizar un estudio detallado de la transformación por hidrólisis enzimática de la biomasa de dicha especie.

Los objetivos parciales que se han abordado en el desarrollo de este trabajo para la consecución del objetivo final del mismo, han sido los siguientes:

1. Obtención de un complejo celulolítico a partir de *Trichoderma reesei* QM9414. Este apartado ha incluido el estudio de las condiciones de crecimiento del microorganismo y de la producción de enzimas, así como la caracterización de la actividad enzimática de la preparación obtenida y de las condiciones óptimas de hidrólisis para dicha preparación.
2. Evaluación de la efectividad de distintos pretratamientos sobre el rendimiento de la hidrólisis de la biomasa de *O. nevosum*. Este estudio ha incluido el seguimiento de las alteraciones experimentadas por los otros compuestos mayoritarios de la biomasa, hemicelulosa y lignina con objeto de dar una visión global del efecto del pretratamiento sobre dicho material, y
3. Seguimiento del proceso de hidrólisis de *O. nervosum* pretratado de acuerdo con las condiciones óptimas seleccionadas en el apartado anterior y utilizando el complejo enzimático producido en la primera fase del trabajo.

3. MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS.

3.1. PRODUCCION DE CELULASAS.

3.1.1. Cepas productoras de celulasas.

El organismo ideal para la obtención de celulasas es aquél que siendo estable, produce altas concentraciones del complejo enzimático completo, con un bajo requerimiento en nutrientes solubles, en un corto tiempo, sin ser además susceptible a ningún tipo de represión catabólica. Los que más se ajustan a este modelo ideal de productor son los mutantes de *T. longibrachiatum*. Para el desarrollo del trabajo de investigación correspondiente a esta memoria, se ha utilizado el mutante QM 9414. El complejo enzimático producido es completo (endoglucanasas, celobiohidrolasa y β -glucosidasa), extracelular y con actividad suficiente como para abordar la hidrólisis de la celulosa.

La cepa QM 9414 es lo suficientemente estable, como para permitir su manejo en medios sólido o líquido mediante las técnicas de resiembra e inoculación habituales.

3.1.2. Cepa productora.

Para la obtención de las celulasas se utilizó la cepa QM9414 del mutante hiperproductor *Trichoderma longibrachiatum* (CECT 2414), procedente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) vía Colección Española.

3.1.3. Medios necesarios para el mantenimiento, caracterización, crecimiento y producción.

Para desarrollar las diferentes etapas que integran el proceso de producción de celulasas a partir de microorganismos fue necesario utilizar distintos medios sólidos o líquidos para mantener las cepas, comprobar su estabilidad, o para abordar la fase de producción masiva de enzimas. Dichos medios, son los que se describen a continuación.

3.1.3.1. Medios sólidos de crecimiento.

La preparación de un inóculo destinado a producción de enzimas utilizando estos mutantes, requiere disponer de suspensiones de esporas procedentes de cultivos jóvenes, (7-14 días) sobre medios sólidos. Para el crecimiento y conservación de las mismas se han utilizado los medios comerciales convencionales de agar-patata o de agar-malta. Cuando se observó un mal crecimiento sobre medios sintéticos, se pasó a utilizar sustratos naturales como patata cocida. En el anexo I se encuentra recogido la composición de dicho medio.

3.1.3.2. Medios líquidos para la preparación de inóculo y para la producción en fermentador.

Para la preparación de inóculos y medios nutritivos de crecimiento en matraz y fermentador se utilizó un medio líquido salino, fuertemente tamponado, al que se añadió el sustrato hidrocarbonado que actuaría como inductor en la síntesis de celulasas. La composición del medio fue variable según la concentración de sustrato. En el anexo I se muestra la composición de los diferentes medios empleados.

3.1.3.3. Preparación del inóculo.

Para la preparación del inóculo se partió de una suspensión de esporas obtenidas a partir de cultivos en medio sólido de 7-14 días de edad. Las suspensiones de esporas contenían 2,5-3,0 10^6 esporas/ml, añadiéndose 1 ml de la suspensión por cada 100 ml de medio salino del inóculo.

El pH inicial del inóculo se ajustó a 5,5-6. Se mantuvo a 28°C y una agitación que garantizaba una buena oxigenación del medio, sin alterar el micelio ni los agregados de micelo-celulosa que se producen.

3.1.4. Condiciones físico-químicas necesarias para la puesta en marcha de la producción en fermentador.

El inóculo bien crecido se añadió al medio de producción del fermentador, que contenía como única fuente hidrocarbonada celulosa. El fermentador utilizado para la producción de celulasas fue un fermentador Biotec de 2-9 litros de capacidad, en el que se pueden prefijar las condiciones de temperatura (28-30°C) y agitación (200 rpm). El pH del medio del fermentador se ajustó entre 5-5,5 prefijándose el nivel mínimo de pH a alcanzar en 3,5. La adición de base o ácido (NH_4OH 2N o ácido fosfórico 0,5N) era automática, mediante bomba peristáltica y en las cantidades requeridas por la marcha del proceso. La temperatura se fijó durante el proceso en 28-30°C. La adición de antiespumante, también automática, estaba controlada por una sonda de contacto. Un problema que se planteó frecuentemente fue la formación de espumas. La espuma que apareció generalmente alrededor de las 60 horas era muy consistente y difícil de eliminar una vez formada, aún incluso mediante el empleo de antiespumante. Sólo corrigiendo la aireación y la agitación se logró minimizar en parte el problema. Parece que el alto contenido en proteínas del medio es la causa del aumento gradual de espumas a partir de cierto momento del proceso. La concentración de sustrato utilizado (Solka Flock HW 200) fue del 1 y 2 % (P/V).

3.2. ESTUDIO DEL COMPLEJO CELULOLITICO

3.2.1. Precipitación y concentración del complejo enzimático.

Una vez finalizado el proceso de producción en fermentador, se procedió a la separación a partir del medio líquido de la fracción que contenía las enzimas. Para ello, se vació el

fermentador y se pasó el medio de cultivo por unos filtros de luz de malla de 0,1 mm de diámetro. Con esta primera filtración se lograba separar la fracción de celulosa y micelio del medio líquido. Se realizó posteriormente otra filtración, con el fin de eliminar los sólidos en suspensión restantes. Finalmente el complejo enzimático fue concentrado, a partir del líquido obtenido por filtración del medio de cultivo del hongo, utilizando un equipo tangencial (PELLICON, Millipore) que permite concentrar hasta 9 veces, moléculas disueltas cuyo peso molecular sea superior a 10.000, entre las que se encuentran los componentes del complejo celulolítico. Sobre este concentrado se realizaron las determinaciones finales del proceso. Para la conservación de las enzimas obtenidas, el concentrado obtenido fue liofilizado y conservado en nevera hasta su utilización.

La determinación de las actividades y cinéticas del complejo enzimático así como los estudios de hidrólisis se llevaron a cabo en un principio disolviendo el liofilizado en tampón citrato 0,05M, pH 4,8. Sin embargo, los análisis posteriores del liofilizado por HPLC presentaron problemas derivados de la interacción entre dicho tampón y los componentes de las columnas de separación. Por este motivo, se procedió a una selección entre distintos tampones de diferente molaridad, con objeto de encontrar uno en el que la actividad del complejo no resultara afectada y que no presentara los inconvenientes citados anteriormente. Entre los tampones ensayados: citrato, fosfato y acetato con concentraciones molares que variaron desde 0,025 M hasta 0,15 M, se eligió el acetato 0,1 M que cumplía los requisitos indicados y que sustituyó desde ese momento al tampón citrato 0,05M en todos los ensayos de hidrólisis.

3.2.2. Medida de la actividad enzimática.

Puesto que el complejo enzimático está constituido por diversas enzimas es necesario emplear diferentes ensayos para determinar las diferentes actividades enzimáticas. Las tres pruebas más utilizadas para establecer la capacidad de un complejo celulolítico de hidrolizar celulosa son: la actividad sobre papel de filtro, la actividad sobre carboxi-metil-celulosa (CMC) y la actividad de β -glucosidasa. A continuación, se recoge la metodología detallada para la realización de cada una de estas pruebas, de acuerdo con las normas elaboradas por la IUPAC en 1984 con objeto de unificar los distintos métodos que habían sido utilizados hasta esa fecha y que dificultaban por tanto la comparación de resultados entre distintos grupos de trabajo (Ghose, 1987).

3.2.2.1. Determinación de la actividad sobre papel de filtro.

Reactivos

- Tira de papel de filtro Whatman n°1 (1 x 6 cm).
- Tampón citrato 0,05M, pH 4,8.
- DNS.
- Solución de glucosa en tampón citrato (10 mg/ml).

Procedimiento

1. Deben hacerse al menos dos diluciones en tampón citrato de la solución de enzima cuya actividad se quiere medir. Una de ellas debe liberar en el medio de reacción algo menos de 2 mg y la otra algo más de 2 mg de azúcares reductores expresados como glucosa. Aunque las diluciones que liberan esta cantidad de reductores deben ser estudiadas para cada caso particular, se puede deducir de nuestras experiencias con distintas soluciones de celulasas, que éstas corresponden, generalmente, a concentraciones de proteínas solubles (calculadas según el método de Lowry) comprendidas entre 0,1 mg/ml y 1 mg / ml.
2. Los patrones de glucosa se preparan a partir de una solución de glucosa, en tampón citrato 0,05M, pH 4,8 de 10 mg/ml de concentración. Las diluciones, realizadas con el mismo tampón citrato, tienen una concentración final de 3,3; 2,5; 1,65 y 1,0 mg en 0,5 ml respectivamente.
3. La reacción enzimática se lleva a cabo en tubos de ensayo de unos 25 ml de capacidad. En la siguiente tabla, se detallan los volúmenes de reactivos que se incorporan en las distintas muestras.

	MUESTRA PROBLEMA	PATRONES GLUCOSA	BLANCO ENZIMA	CERO
Tampón citrato	1 ml	1 ml	1 ml	1,5 ml
Disolución enzima (2 diluciones)	0,5ml	-----	0,5ml	-----
Glucosa	---	0,5 ml*	----	----
Tira de papel	1	----	----	1

* de la dilución de glucosa correspondiente.

4. Las muestras problemas se atemperan a 50°C antes de añadir la tira de papel de filtro. Es importante que el papel quede sumergido, en su mayor parte, en la mezcla de reacción. La incubación de las muestras se realiza durante 60 minutos a 50°C en un baño de agitación.
5. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se añade 3 ml del reactivo 3,5-dinitrosalicílico (Anexo I) a todos los tubos, incluyendo muestras problemas, patrones de glucosa, blanco de enzima y cero. Después de agitar se introducen durante cinco minutos en un baño con agua hirviendo y se transfieren posteriormente a un baño de agua fría. Se añaden 20 ml de agua destilada a cada tubo y se agitan invirtiéndolos varias veces hasta que la mezcla sea uniforme. Luego se deja reposar unos 20 minutos para que la pulpa de papel se deposite en el fondo de los tubos y se lee la densidad óptica del sobrenadante a 540 nm. frente al blanco de enzima.

Cálculo de la actividad.

Definición de la unidad de papel de filtro (UPF).

La UPF está basada en la Unidad Internacional (UI), que corresponde a una conversión de sustrato de 1 μmol en 1 minuto. En el caso de actividad enzimática sobre papel de filtro, la UPF se define como la formación de 1 $\mu\text{mol}/\text{min.}$ de azúcares reductores medidos como poder reductor de glucosa, en las condiciones de ensayo descritas previamente.

Debido a la ausencia de linealidad entre la dilución de enzima y los azúcares reductores liberados durante el ensayo, la actividad enzimática sobre papel de filtro debe medirse a una concentración de enzima que libere en el medio de reacción una cantidad absoluta de 2 mg de azúcares reductores, expresados como glucosa, que es el punto en donde la relación entre ambas variables se hace razonablemente lineal. Haciendo las transformaciones correspondientes se comprueba que 2 mg de glucosa en las condiciones de ensayo descritas corresponde a 0,37 μmoles de glucosa liberados por minuto y por ml de la dilución enzimática ensayada o lo que es lo mismo 0,37 UI por ml de dilución.

Cálculo de las UPF de la disolución enzimática.

1. Se ajustan los valores de absorbancia obtenidos para los distintos patrones de glucosa a una recta.
2. Se calculan sobre la ecuación de esa recta los valores de glucosa que corresponderían a las absorbancias obtenidas para las muestras problema (después de deducir el valor del blanco de enzima correspondiente).
3. Se representan en papel semilogarítmico los valores de glucosa obtenidos frente a las concentraciones (inversas de las diluciones) de solución de enzima correspondiente, y se estima el valor de la concentración que liberaría exactamente 2 mg de azúcares reductores.
4. Se calcula la actividad (UPF) :

$$\text{UPF} = \frac{0,37}{C} \text{ unidades ml}^{-1}$$

C= concentración de enzima que liberaría 2,0 mg de glucosa.

Cuando se trate de disoluciones de baja actividad enzimática, puede ser que incluso la muestra no diluida libere en el ensayo menos de los 2 mg. de azúcares reductores. En este caso, el cálculo de actividad se realiza a partir de la cantidad de glucosa liberada empleando la siguiente expresión:

UPF/ml de solución de enzima=mg.de glucosa liberados x 0,185*

*1 mg. de glucosa liberada equivale a 0,185 UI/ml:

$$1\text{mg de glucosa} \Rightarrow \frac{1,0}{0,18 \times 0,5 \times 60} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} = 0,185 \text{ UI} \cdot \text{ml}^{-1}$$

3.2.2.2. Determinación de la actividad sobre CMC.

Reactivos:

- Carboximetilcelulosa (1%). La carboximetilcelulosa (viscosidad media, D.S.=0.5) se disuelve en agua caliente y luego se añade tampón citrato 0,5M pH=4.8 en una proporción tal que la concentración final de citrato sea 0,05M.
- Tampón citrato 0,05M, pH 4,8.
- DNS.
- Solución de glucosa en tampón citrato (10 mg/ml).

Procedimiento:

1. Deben hacerse al menos dos diluciones en tampón citrato de la disolución de enzima cuya actividad se quiere medir. Una de ellas debe liberar en el medio de reacción algo menos de 0,5 mg y la otra algo más de 0,5 mg de azúcares reductores expresados como glucosa.
2. Los patrones de glucosa se preparan a partir de una disolución de glucosa, en tampón citrato 0,05M, pH 4,8 a una concentración de 5 mg/ml. Las diluciones, realizadas con el mismo tampón citrato, tienen una concentración final de 1,0; 0,7; 0,5 y 0,25 mg en 0,5 ml respectivamente.
3. La reacción enzimática se lleva a cabo en tubos de ensayo de unos 25 ml de capacidad. En la siguiente tabla, se detallan los volúmenes de reactivos que se incorporan en las distintas muestras.
4. Las muestras problemas se incuban a 50°C durante 30 minutos en un baño de agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se añade 3 ml del reactivo 3,5-dinitrosalicílico (ver anexo I) a todos los tubos, incluyendo muestras problemas, patrones de glucosa, blanco de enzima y cero. Se agita y se introducen durante cinco minutos en un baño con agua hirviendo y se transfieren posteriormente a un baño de agua fría. Se añade 20 ml de agua destilada a cada tubo y se agita invirtiéndolos varias veces hasta que la mezcla sea uniforme y se lee la densidad óptica de las muestras a 540 nm. frente a la muestra cero.

	MUESTRA PROBLEMAS	PATRONES GLUCOSA	BLANCO ENZIMA	CERO
CMC (1%)	0,5 ml	-----	-----	-----
Tampón citrato	-----	0,5 ml	0,5 ml	1 ml
Disolución enzima (2 diluciones)	0,5 ml	-----	0,5 ml	-----
Glucosa	-----	0,5 ml*	-----	-----

* de la dilución de glucosa correspondiente.

Cálculo de la actividad.

Teniendo en cuenta que la relación entre concentración de enzima y azúcares reductores liberados se hace aproximadamente lineal cuando, la cantidad de azúcares reductores liberados como glucosa oscila alrededor de 0,5 mg (en las condiciones de ensayo descritas previamente), la actividad sobre CMC debe medirse utilizando diluciones de enzima que produzcan algo más y algo menos de este valor para así deducir la concentración de enzima que liberaría exactamente 0,5 mg de glucosa.

De acuerdo con el valor de Unidad Internacional, definido en el apartado correspondiente a la actividad sobre papel de filtro, se deduce que 0,5 mg de glucosa corresponden a 0,185 μ moles de glucosa por minuto y por ml de la dilución enzimática ensayada, es decir, 0,185 UI/ml.

Cálculo de la actividad sobre CMC en la disolución de enzima.

1. Se ajustan los valores de absorbancia obtenidos para los distintos patrones de glucosa a una recta.
2. Se calculan sobre la ecuación de esa recta los valores de glucosa que corresponden a las absorbancias obtenidas para las muestras problema (después de deducir el valor del blanco de enzima correspondiente).
3. Se representan en papel semilogarítmico los valores de glucosa obtenidos frente a las concentraciones (inversas de las diluciones) de solución de enzima correspondiente, y se estima el valor de la concentración que liberaría exactamente 0,5 mg de azúcares reductores.

4. Se calcula la actividad CMC:

$$CMC = \frac{0,185}{C} \text{ UI ml}^{-1}$$

C= concentración de enzima que liberaría 0,5 mg de glucosa.

3.2.2.3. Determinación de la actividad de β -glucosidasa (Bailey et al.1981).

Reactivos:

- 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (Merck Rfa 6753) 1mM en tampón citrato 0,05 M pH 4,8.
- Solución de 4-nitrofenol (10 μ g/ml) en tampón citrato 0,05 M pH 4,8
- Carbonato sódico 1M

Procedimiento

1. A partir de una disolución de 4-nitrofenol en tampón citrato (10 μ g/ml), se preparan las disoluciones que se utilizan como patrones con las siguientes concentraciones: 10; 7,5; 5; 2,5 y 1,25 μ g/ml.
2. La reacción enzimática que consiste en la liberación de 4-nitrofenol a partir de 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido se lleva a cabo en baño de agitación a 50°C durante 10 minutos. Las muestras se preparan como se detalla en la siguiente tabla.

	MUESTRA		
	PROBLEMA	PATRONES	CERO
4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido 1 mM	1,8 ml	-----	1,8 ml
Solución enzima	0,2 ml	-----	-----
4-nitrofenol	-----	2 ml*	-----
Tampón citrato 0,5 M pH 4,8	-----	-----	0,2 ml

*de la dilución de 4-nitrofenol correspondiente.

3. Transcurridos los 10 minutos, la reacción se detiene añadiendo a cada muestra 1 ml de Na₂CO₃ 1 M. La lectura de la absorbancia se realiza a 400 nm frente a la muestra cero.

Cálculo de la actividad.

La actividad enzimática de β -glucosidasa se suele expresar en nKat. El nKat se define como la cantidad de enzima que libera 1 nmol/s de 4-nitrofenol en la mezcla reaccionante en las condiciones descritas (1nkat= 0,06 UI).

3.2.3. Determinación de proteínas solubles.

El método empleado para la determinación de proteínas fue el de Lowry y col. (1950), que tiene como fundamento la aparición de color, resultado de la reacción de Biuret de las proteínas con el ión cobre en medio alcalino y de la reducción del fosfomolibdico-fosfotúngstico por la tirosina y el triptófano presentes en las proteínas totales.

Procedimiento:

Se utiliza un volumen de muestra de 1 ml, en una concentración presumible de proteínas comprendida en la curva patrón (preparada con disoluciones de seroalbúmina entre 50 y 200 μ g/ml). Se añaden 5 ml de la disolución C (ver Anexo I), se agita y se dejan en reposo 10 minutos. Transcurrido este tiempo se añaden 0,5 ml de reactivo D (Anexo I), se agita inmediatamente, y se dejan las muestras 30 minutos en reposo para conseguir el desarrollo de color. La lectura de la absorbancia se realiza en espectrofotómetro a longitud de onda de 757 nm frente a un blanco tratado de forma idéntica a la muestra problema en el que esta última es sustituida por agua destilada.

3.3. CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA Y DE LOS PRODUCTOS DE HIDROLISIS.

En este apartado se indican los métodos analíticos utilizados para caracterizar la materia prima tanto nativa como pretratada y los productos de hidrólisis de la biomasa lignocelulósica:

3.3.1. Materia prima.

Como materia prima de partida en este trabajo se ha utilizado parte aérea desecada (6-10% humedad) del cardo *Onopordum nervosum* boiss procedente de una plantación experimental situada en los Campos de Prácticas de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid.

La fotografía de la figura 13, muestra algunos ejemplares de la citada especie en los que se puede observar el gran desarrollo que alcanzan las plantas, algunas veces de altura superior a los 3.5 metros.



Figura 13. Onopordum nervosum Boiss

3.3.2. Caracterización de la materia prima.

3.3.2.1. Determinación de la humedad : según norma Tappi, T-11m-59.

3.3.2.2. Determinación de la solubilidad en NaOH 1%:norma Tappi T-4m-59.

3.3.2.3. Determinación de la solubilidad en agua(fría y caliente):norma Tappi T-1m-59.

3.3.2.4. Extracto en éter : norma Tappi T-5m-59.

3.3.2.5. Extracto en alcohol-benceno: norma Tappi T-6m-59.

3.3.2.6. Análisis de componentes. Hidrólisis total con ácido sulfúrico.

Existen diversos métodos para el estudio de la composición en celulosa, hemicelulosa y lignina de biomasa lignocelulósica. Después de algunos estudios previos realizados sobre *Onopordum nervosum* en los que se evaluaron tanto los resultados obtenidos como la complejidad de dichos métodos se decidió emplear el método descrito por Puls (Puls et al., 1985).

Este método que consiste en una hidrólisis total con H₂SO₄, se lleva a cabo sobre el sustrato seco (100°C) como se describe a continuación (figura 14).

Se pesan 200 mg. de producto y se añaden 2 ml. de H₂SO₄ 72% (P/P) se homogeniza en mortero hasta conseguir una impregnación total del material y se deja en estufa a 30°C durante 1 hora, removiendo varias veces durante este tiempo. Después se transfiere el material cuantitativamente a un frasco sovirel de 100 ml y se añade H₂O (56 ml) para diluir el H₂SO₄ hasta el 4%.

La segunda hidrólisis se realiza durante 1 hora a 120°C. Después se deja enfriar despresurizando lentamente el autoclave para evitar sobreebullición de hidrolizado. La muestra se deja enfriar y se neutraliza a pH 5-6 con Ba(OH)₂. Una vez neutralizada la muestra se filtra por membrana Millipore de 0,45 μ , y se recoge el filtrado para análisis posterior.

Para la determinación de los azúcares reductores se siguió el método propuesto por Somogyi (1954) y modificado por Nelson (1944). Mientras que para la determinación de glucosa se utilizó el método enzimático de la 6-hexoquinasa comercializado por Boehringer (Anexo I).

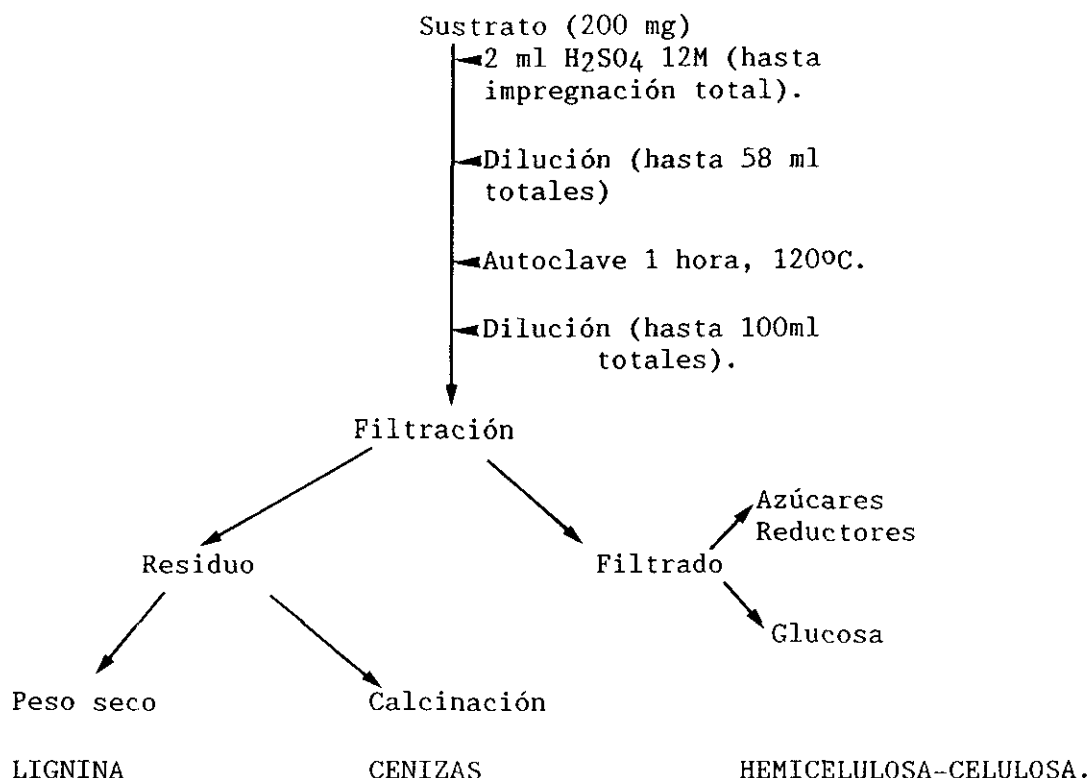


Figura 14. Procedimiento realizado para el estudio de la composición de la biomasa lignocelulósica.

3.3.2.6.1. Determinación de lignina (lignina "Klason").

La determinación de lignina de la biomasa lignocelulósica (tanto nativa como tratada) se ha efectuado sobre el residuo resultante de la hidrólisis total con ácido sulfúrico tal y como se recoge en el esquema de la figura 14.

El residuo sólido resultante de dicha hidrólisis es filtrado sobre filtro Millipore de $0,45 \mu$ previamente pesado. El residuo sólido se deja secar en estufa a 80°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se pesa hasta peso constante. Se calcina el residuo en mufla a 550°C durante 3 horas (norma TAPPI, T-15m-58) calculándose el contenido en lignina por la diferencia de peso entre el residuo seco y el peso de cenizas resultante.

3.3.2.7. Determinación de cenizas: norma TAPPI, T-15m-58.

3.3.2.8. Determinación de nitrógeno total.

El contenido en nitrógeno se determinó por el método Kjeldahl (Coombs et al., 1985), empleándose para la digestión de la materia orgánica ácido sulfúrico concentrado, así como una mezcla digestora que actúa como catalizador y cuyo contenido es el siguiente:

Sulfato potásico87 g.
Sulfato de cobre4,35 g.
Sulfato ferroso.8,65 g.

De esta mezcla, una vez homogeneizada, se utiliza 1 g. para cada determinación. Después de realizada la digestión de 500 mg de materia seca se destila el amoníaco, previo desplazamiento de éste con NaOH al 40%. El destilado se recoge sobre ácido bórico al 4% que contiene unas gotas de indicador Shiro-Tashiro, y se valora después el amoníaco con H₂SO₄ 0,01N.

El tanto por ciento de nitrógeno en la muestra se calcula utilizando la siguiente expresión:

$$y = \frac{14 \times N \times V \times F}{10 \times P}$$

donde:

y = % de nitrógeno en la muestra.

N, F, V = normalidad, factor y volumen de H₂SO₄ utilizado en la valoración.

P = peso de la muestra expresado en gramos.

3.4. PRETRATAMIENTOS.

Se ha realizado un estudio exhaustivo de distintos pretratamientos físicos, químicos y biológicos utilizando como referencia aquellos que resultaron más eficaces al ser aplicados a sustratos lignocelulósicos de características similares a las de *Onopordum nervosum*.

3.4.1. Molienda.

Para cualquier manipulación o tratamiento posterior, la biomasa vegetal debe ser previamente reducida a un tamaño de partícula adecuado. La evaluación del efecto de los distintos grados de molienda se ha llevado a cabo sobre la biomasa desecada previamente en estufa a 60°C (6 % de humedad), utilizando un molino de cuchillas tipo Restsch, con

tamices de los siguientes tamaños de luz de malla: 0,25, 0,5, 0,75, 1 y 2 mm. A partir de los resultados obtenidos y que se exponen en el apartado correspondiente, se decidió utilizar el tamiz de 2 mm para todos los estudios posteriores que se describen en este trabajo.

3.4.2. Pretratamientos alcalinos.

3.4.2.1. Pretratamiento con hidróxido sódico.

Los pretratamientos con NaOH se llevaron a cabo en baño de silicona a 25°, 100°, 120° y 150°C, utilizando disoluciones de NaOH al 1 y 2 % (P/V) y una relación sólido-líquido del 5%. Los tiempos de reacción estudiados variaron desde 0 a 90 minutos.

3.4.2.2. Tratamiento con hidróxido cálcico.

Este pretratamiento se realizó utilizando disoluciones de Ca(OH)_2 al 0,2 y 1,8%, tres temperaturas diferentes, 4°, 25° y 100°C y tiempos de tratamiento de 24 y 48 horas para los realizados a 4 y 25°C, y 10 y 30 minutos para el efectuado a 100°C. La relación sólido-líquido para dicho pretratamiento fue del 5%.

3.4.3. Pretratamiento oxidante.

3.4.3.1. Pretratamiento con peróxido de hidrógeno.

A un gramo de sustrato lignocelulósico se le añadieron 50 ml de una solución de H_2O_2 al 1 %. El pH de la suspensión resultante se ajustó a 11,5 con NaOH 3N y se mantuvo con agitación durante 24 horas a temperatura ambiente.

3.4.3.2. Pretratamiento con hipoclorito sódico.

El tratamiento con hipoclorito sódico se efectuó de manera que la relación gramos de cloro por gramo de sustrato a pretratar fuera de 0,7 ó 0,9, y la relación sólido-líquido final del 10%. El pH de la mezcla de reacción fue ajustado a 7 con ácido acético glacial y el tratamiento se efectuó a temperatura ambiente durante 15 horas.

3.4.4. Pretratamientos ácidos.

El pretratamiento en medio ácido se ha llevado a cabo utilizando ácidos clorhídrico, sulfúrico y acético. La relación sólido-líquido para estos tratamientos fue del 5% y en todos los casos las condiciones ensayadas fueron las siguientes:

3.4.4.1. Pretratamiento con ácido clorhídrico.

Temperatura: 25°, 70° y 100°C.

Concentración de ácido: 0,5%, 1% y 5%.

Tiempo: 1,3, y 5 horas

3.4.4.2. Pretratamiento con ácido sulfúrico.

Temperatura: 100°C

Concentración de ácido: 0,2%, 0,5%, 1% y 2%.

Tiempo: 1, 3 y 5 horas.

3.4.4.3. Pretratamiento con ácido acético.

Temperatura: 70° y 100°C

Concentración de ácido: 1 y 5%

Tiempo: 1, 3 y 5 horas.

3.4.5. Pretratamiento con solventes orgánicos

Se ha estudiado el efecto del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica con etanol, butanol y butilamina. Los primeros se llevaron a cabo en presencia de distintos catalizadores descritos en la bibliografía por su efectividad en el tratamiento de sustratos similares al *O. nervosum*.

El pretratamiento con n-butilamina se llevó a cabo utilizando las condiciones descritas en la bibliografía para la deslignificación de paja de arroz. El sustrato fue tratado con una solución de n-butilamina al 1% a temperatura de 120°C durante 2 horas utilizando relaciones sólido-líquido del 25 y 10%.

En la tabla siguiente se recogen las condiciones en las que se llevaron a cabo los pretratamientos con etanol y butanol.

SOLVENTE	TEMPERATURA	TIEMPO	SOLIDO/LIQUIDO(%)
Etanol:Agua (1:1)	120°C	1hora	20
	160°C	30min.	20
	175°C	30min.	20
Butanol:Agua (1:1)	120°C	1hora	20
Etanol:NaOH 1N (1:1)	120°C	1hora	20
	160°C	1hora	20
Butanol:NaOH 1N (1:1)	120°C	1hora	20
	160°C	1hora	20
Etanol:H ₂ SO ₄ 0,1N (1:1)	120°C	1hora	20
	160°C	1hora	20
Butanol:H ₂ SO ₄ 0,1N (1:1)	120°C	1hora	20
	160°C	1hora	20
Etanol:Fenol (1:1)	120°C	1hora	20
Butanol:Fenol (1:1)	160°C	1hora	20

Una vez efectuados los pretratamientos químicos en las condiciones antes descritas, la suspensión de biomasa resultante fue filtrada a través de papel de filtro y lavada hasta eliminación de los restos del agente químico utilizado en cada caso. Sobre el residuo sólido recogido y secado en estufa a 60°C se realizaron todos los estudios posteriores de composición y rendimiento de hidrólisis enzimática.

3.4.6. Pretratamiento de irradiación.

Se llevó a cabo en la unidad de irradiación NAYADE del CIEMAT que consiste en una fuente de tipo piscina de 7.700 Ci de ⁶⁰Co distribuidos en doce elementos activos. Las muestras fueron irradiadas a las siguientes dosis: 20, 50 y 100 Mrad. El flujo con el que se realizó la irradiación fue de 2.41 Mrad/hora. La dosimetría de las fuentes se realizó mediante el método dosimétrico químico Fricke.

Los recipientes que contenían las muestras a irradiar, fueron introducidos en contenedores herméticos de acero inoxidable, que fueron ajustados posteriormente en el dispositivo de irradiación. La geometría de las fuentes de ^{60}Co en dicho dispositivo fue mantenida constante durante todas las experiencias para garantizar la homogeneidad en la distribución de la dosis.

Las muestra fueron irradiadas directamente o suspendidas en agua o medio ácido (HCl , H_2SO_4 , y $\text{CH}_3\text{-COOH}$ al 1 %). En estos dos últimos casos la proporción sólido-líquido fue del 5%.

Como en el caso de los tratamientos químicos antes descritos, el sustrato pretratado fue filtrado, lavado y secado a 60°C en estufa. Sobre el sólido resultante se llevaron a cabo los estudios de composición y rendimiento de hidrólisis enzimática.

Sobre los residuos sólidos obtenidos en el tratamiento de irradiación en seco y agua se estudió el efecto de un pretratamiento posterior en medio ácido (sulfúrico, clorhídrico o acético). Las condiciones de este segundo tratamiento, que fueron elegidas después de un rastreo previo realizado con bajas concentraciones de ácido, se detallan a continuación:

ácido	Concentración (%)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Tiempo (horas)
HCl o H_2SO_4	1%	100	5
$\text{CH}_3\text{-COOH}$	1%	70	3

La relación sólido-líquido a la que fueron efectuadas estos pretratamientos fue del 5%.

3.4.7. Pretratamiento de explosión por vapor.

Este pretratamiento se llevó a cabo en una unidad piloto, diseñada para este fin, por la empresa INTECSA y construida en las instalaciones del CIEMAT. El diagrama de flujo de la instalación mencionada se recoge en la figura 15.

Dicho sistema incluye un generador de vapor con el que se alimenta el reactor de explosión en el que se introduce el material lignocelulósico. Gracias a la súbita apertura de la válvula de descarga del reactor, se expansiona el material bruscamente y se descarga en un ciclón donde finalmente es recogido para su tratamiento posterior.

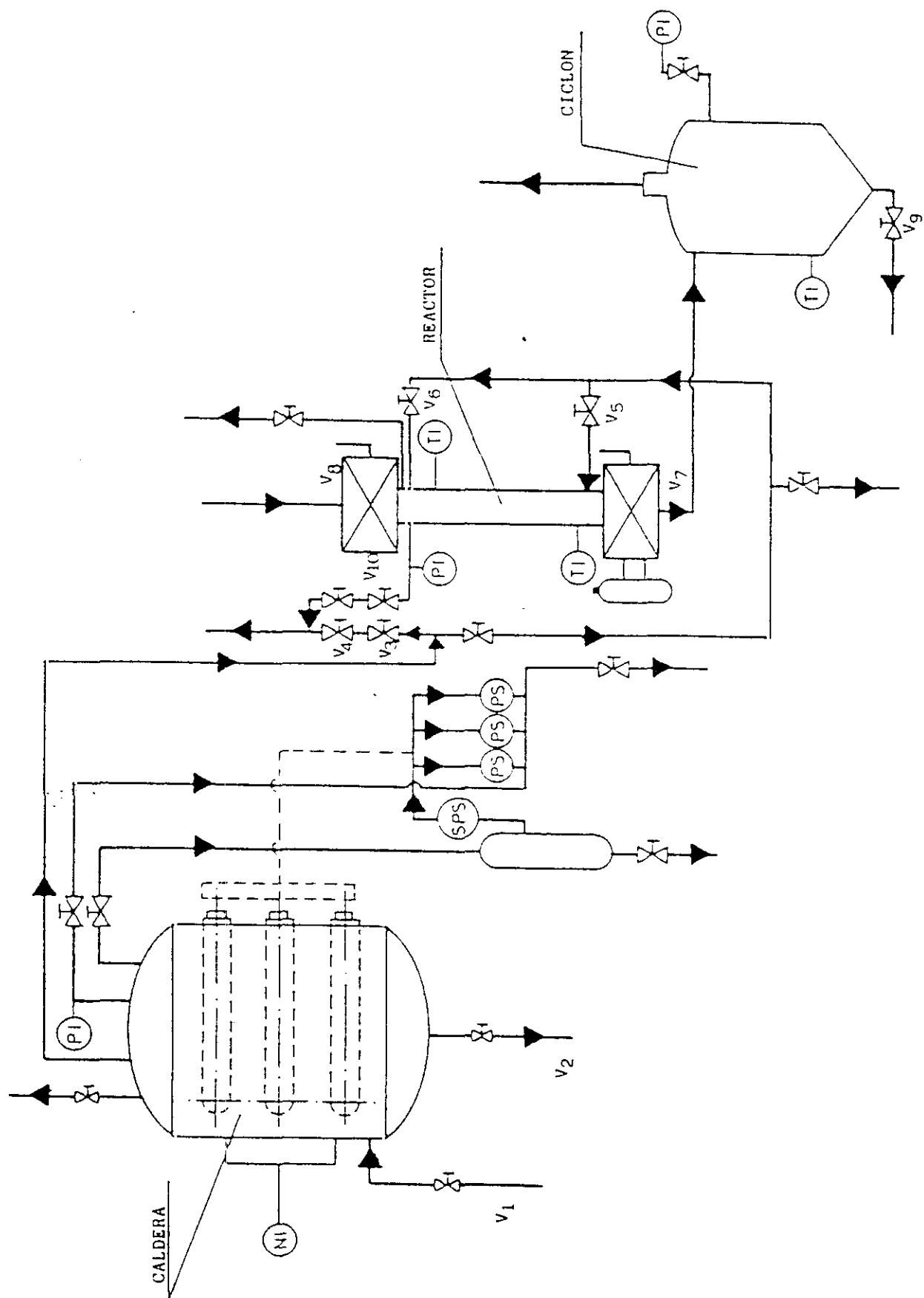


Figura 15. Esquema del diagrama de operación de la planta piloto de tratamiento de material lignocelulósico.

El reactor de explosión es la cámara donde la biomasa es comprimida y súbitamente despresurizada. La capacidad del cuerpo del reactor es de 2 litros, y está provisto de válvulas de carga y descarga de biomasa de 3 pulgadas. La presión máxima de trabajo con vapor saturado es de 42 bares absolutos. El material es de acero inoxidable AISI 316 y posee además elementos de control y seguridad (2 termómetros, un manómetro y una válvula de seguridad).

La mezcla de vapor y material lignocelulósico expulsado en cada disparo entra al ciclón de descarga horizontal y tangencialmente. El ciclón está construido en acero inoxidable AISI 316, posee una válvula de descarga de tipo tajadera de 3 pulgadas.

Las condiciones de tiempo y temperatura en las que fueron realizados los pretratamientos fueron las siguientes:

Temperaturas: 190°C, 210°C y 230°C.
Tiempos: 30 segundos, 1, 2, 4 y 8 minutos.

Se realizó además un pretratamiento combinado con ácido. La impregnación de la biomasa del cardo se realizó con ácido sulfúrico 0,4 y 1% (relación sólido-líquido 1:4) a 25°C durante 24 horas. Las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas para el pretratamiento de explosión por vapor en condiciones ácidas fueron:

Temperaturas: 170° y 190° C.
Tiempos : 2, 4 y 8 minutos.

3.4.8. Pretratamiento biológico.

El pretratamiento biológico del sustrato lignocelulósico se llevó a cabo utilizando la cepa de *Phanerochaete chrysosporium* (CECT 7754), el sustrato utilizado para este estudio fue *Onopordum nervosum* nativo o pretratado por los tres métodos químicos cuyas condiciones se recogen a continuación:

ácido:	5 gramos de sustrato tratado con 100 ml de una solución de H ₂ SO ₄ al 1%, durante 3 horas a una temperatura de 100°C.
alcalino:	5 gramos de sustrato tratados con 100 ml de una solución de NaOH al 1% durante 10 minutos y a una temperatura de 100°C.
oxidante:	10 gramos de sustrato tratado con 100 ml de una solución de H ₂ O ₂ al 1% y con NaOH 1N hasta pH 11,5, durante 24 horas a temperatura ambiente.

El sustrato nativo o bien el residuo resultante del pretratamiento fue esterilizado en autoclave e inoculado con una suspensión de esporas de $12,8 \times 10^6$ esporas/g.material. El hongo fue incubado a 38°C durante 4 semanas. Las muestras fueron retiradas a los 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación y el residuo obtenido lavado y secado en estufa a

105°C hasta peso constante. Sobre el residuo seco final se realizaron las siguientes determinaciones: análisis de la composición, evaluación de la susceptibilidad del sustrato a la hidrólisis enzimática con celulasas obtenidas de *T. reesei* QM9414.

Para todos los sustratos tratados se procedió al lavado con agua hasta pH neutro, secado en estufa a 60°C, determinándose el peso del residuo seco así como su composición en celulosa y lignina.

3.5. HIDROLISIS ENZIMATICA DE BIOMASA LIGNOCELULOSICA.

3.5.1. Ensayos de hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada.

Una vez realizado el pretratamiento, el residuo pretratado fue sometido a hidrólisis enzimática utilizando celulasas procedentes de *Trichoderma reesei* QM9414. Las pruebas de hidrólisis enzimática se efectuaron en tubos de ensayo en un baño termostatzado con sistema de agitación. Las condiciones en las que se realizaron las pruebas de hidrólisis fueron las siguientes:

- actividad enzimática: 20 UIPF/g. sustrato.
- medio: tampón acetato 0,1M, pH 4.8.
- tiempo de hidrólisis: 48 horas.
- temperatura: 50°C.

Finalizado el período de hidrólisis, las muestras fueron filtradas para separar el residuo insoluble del hidrolizado. La determinación del rendimiento de la hidrólisis se llevó a cabo sobre el hidrolizado valorándose el contenido de azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson y de glucosa por el método enzimático comercial de Boehringer-Manheim (Anexo I).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados, que serán expuestos y discutidos a continuación, están agrupados en tres apartados que se corresponden con las diferentes etapas del desarrollo experimental del trabajo realizado:

- 1- Producción y caracterización de enzimas celulolíticas.
- 2-Evaluación de la eficacia de diferentes pretratamientos sobre el rendimiento de hidrólisis enzimática del *Onopordum nervosum*.
- 3-Estudio del proceso de hidrólisis de *Onopordum nervosum* en condiciones óptimas.

Estos tres apartados se relacionan, asimismo, con las diferentes fases que constituyen un proceso completo de transformación por hidrólisis enzimática: obtención de enzimas, pretratamiento de la materia prima e hidrólisis enzimática del sustrato pretratado.

4.1. Producción y caracterización de celulasas

4.1.1. Estudios de producción enzimática.

Como ya se ha comentado en el apartado correspondiente del capítulo de Introducción, *Trichoderma longibrachiatum* QM9414 reúne una serie de características que le hacen adecuado para su utilización como productor de celulasas. Por un lado, es capaz de producir enzimas con actividad suficiente para degradar "in vitro" la celulosa insoluble a azúcares y además, presenta una estabilidad que permite su manejo en medios sólidos o líquidos mediante las técnicas de resiembra e inoculación habituales. Por estos motivos, esta cepa fue elegida como productora de las enzimas que habrían de ser utilizadas a lo largo del presente trabajo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las primeras pruebas de producción de enzimas, realizadas en matraces con agitación continua, en baño termostatzado, y con el fin de controlar eficientemente las condiciones de cultivo y las cinéticas de producción de enzimas, se decidió llevar a cabo los experimentos definitivos de producción en fermentador de 10 litros de volumen útil. De esta manera, se pretendía además, obtener cantidad de enzima suficiente para ser utilizada en los distintos ensayos de hidrólisis, previstos en el planteamiento del trabajo.

En la figura 16 se muestran las cinéticas de producción de celulasas por *T.longibrachiatum* QM9414 sobre un 1% (p/v) de Solka Floc HW200. Al tratarse de un proceso sin control automático del pH, se observa una disminución del pH a partir del primer día hasta un valor de alrededor de 3, que se mantiene más o menos constante a lo largo del proceso. Este hecho hace que las proteínas presentes en los medios de producción estén sometidas al efecto de un bajo pH durante muchas horas, lo que da lugar a que se provoque una desnaturalización parcial de las mismas, que se acentúa con el paso del tiempo. Es por ello, por lo que se produce una disminución progresiva de las actividades enzimáticas valoradas a pesar de que se siguen secretando proteínas al medio (Blanco, 1990).

La disminución del pH puede estar motivada por la actividad metabólica del hongo, que, al mismo tiempo que degrada el sustrato hidrocarbonado añadido al medio, consume el nitrógeno y proteínas del mismo, rompiendo el tampón y consecuentemente bajando el pH.

Debido a los efectos negativos que ejercen los bajos niveles de pH en el medio sobre la actividad enzimática se decidió, cuando se llevó a cabo el proceso de producción sobre Solka Floc al 2%, controlar el pH de forma que nunca bajase de 4. En estas condiciones las actividades enzimáticas medidas en los medios de producción evolucionaron con la misma tendencia que el contenido en proteínas en el medio (figura 17).

En la tabla XI se recogen las características de las fermentaciones llevadas a cabo y de los rendimientos tanto de proteínas obtenidas como de las actividades enzimáticas finales secretadas al medio.

Los resultados, representados en las figuras 16 y 17 muestran que un aumento de concentración de celulosa en los medios de producción supone un alargamiento del tiempo del proceso. Sin embargo, las actividades enzimáticas valoradas por unidad de peso de proteínas secretadas al final del proceso aumentan un 50% en el caso de la β -glucosidasa y casi un 60% en el caso de la actividad medida sobre papel de filtro, mientras que la actividad sobre CMC disminuyó.

Dado que el elevado coste de la producción de enzimas es uno de los principales inconvenientes a la hora de plantear un proceso de transformación mediante hidrólisis enzimática, es necesario, desde un punto de vista económico, desarrollar procesos de producción basados en la utilización de fuentes de celulosa baratas. Por este motivo, se ha evaluado aquí la posibilidad de utilizar *O.nervosum* como sustrato para la producción de celulasas.

Los estudios se han abordado utilizando tanto sustrato nativo como sometido a dos pretratamientos diferentes:

1. Ácido sulfúrico al 5% (v/v), durante 3 horas a 100°C.
2. Agua oxigenada al 1% (v/v) a pH 11,5 durante 24 horas a 25°C con agitación.

Tipo de sustrato	Solka Floc HW200	Solka Floc HW200
Concentración de sustrato	1 %	2 %
Volumen de producción en fermentador	9 litros	9 litros
Duración del proceso de producción	168 h.	268 h.
Total precipitado con acetona	11,8 g.	13,1 g.
Proteínas *	9,69 g	9,65 g
Actividad β -glucosidasa (UI/mg.proteína)	0,18 UI/mg	0,27 UI/mg.
Actividad sobre PF (UI/mg. proteína)	0,39 UI/mg	0,62 UI/mg
Actividad endoglucanasa (UI/mg proteína)	16,55 UI/mg	9,14 UI/mg

* valoradas en el precipitado por el método de Lowry.

TABLA XI. Características de la producción de enzimas en fermentador.

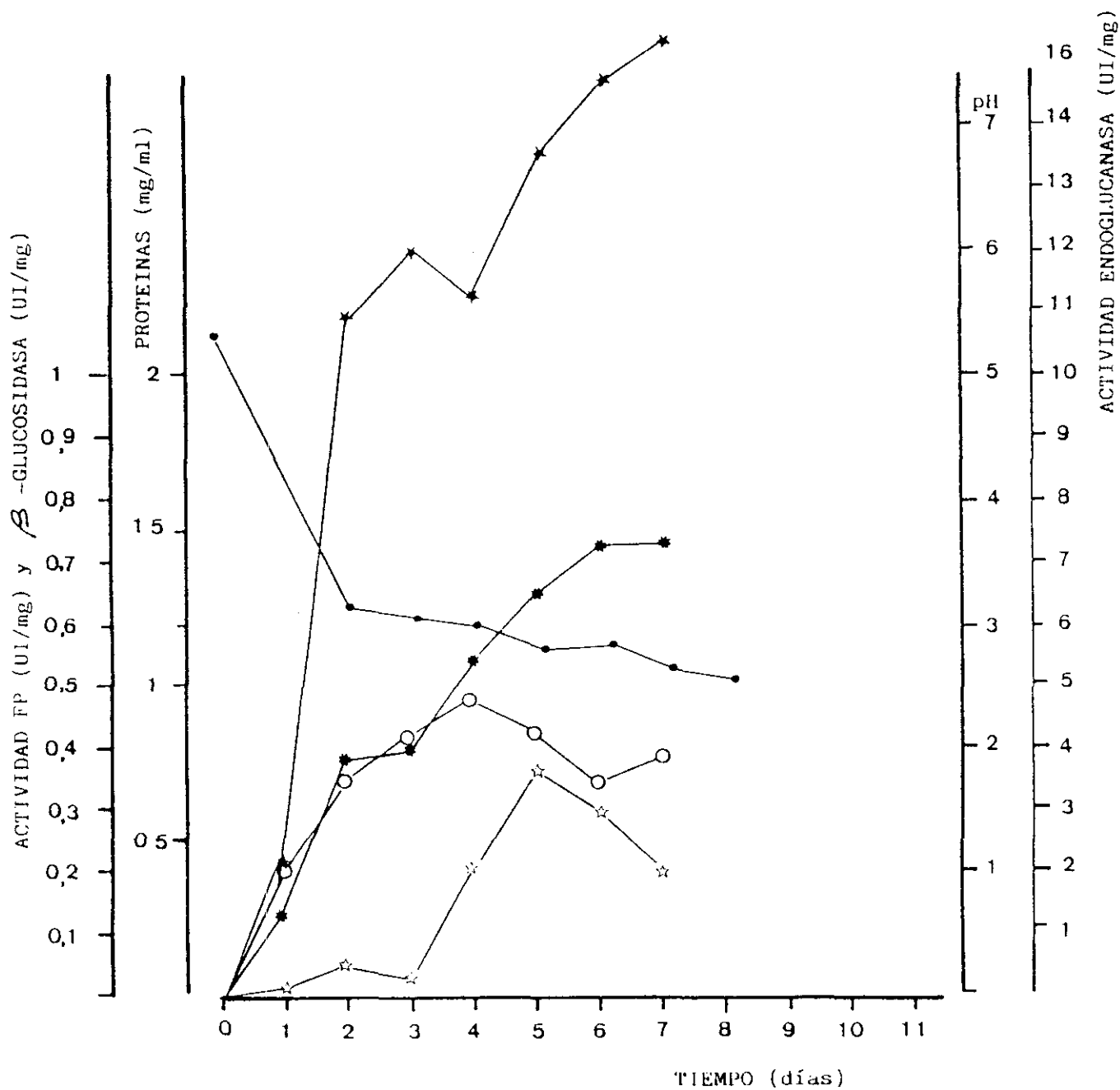


Figura 16. Cinética de producción de celulasas por *T. Longibrachiatum* QM9414 sobre 1% de Solka Floc HW200. Volumen total 9 litros. Evolución de (●) pH. (○) actividad sobre PF. (☆) actividad β -Glucosidasa. (★) actividad endoglucanasa. (✱) proteínas extracelulares a lo largo de 7 días.

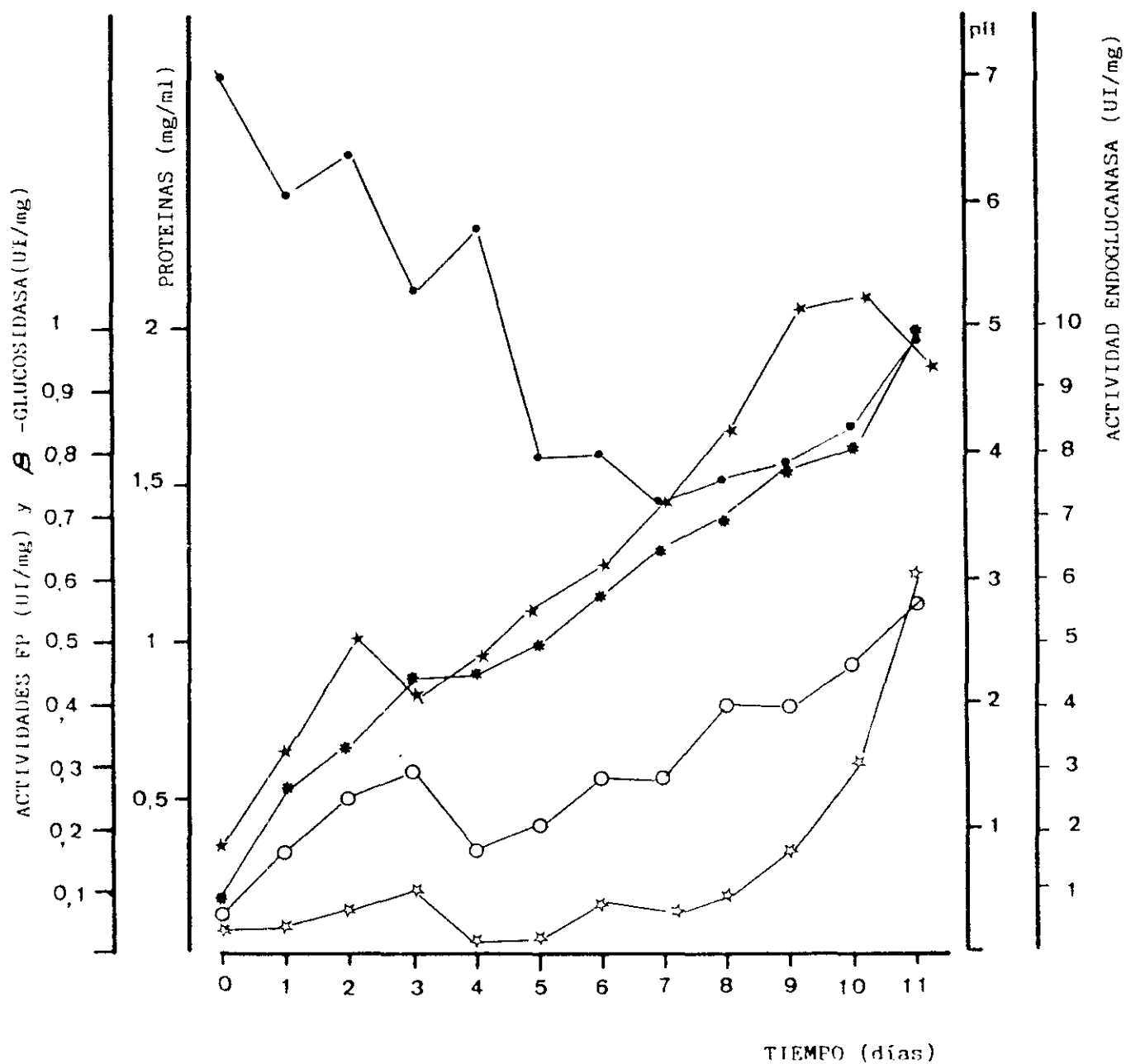


Figura 17. Cinética de producción de celulasas por *T. Longibrachiatum* QM9414 sobre 2% de Solka Floc HW200. Volumen total 9 litros. Evolución de (●) pH, (○) actividad sobre PF, (☆) actividad β -Glucosidasa, (★) actividad endoglucanasa, (✱) proteínas extracelulares a lo largo de 11 días.

Cuando se utilizó como sustrato biomasa lignocelulósica, los mejores resultados en cuanto a crecimiento y producción de enzimas se obtuvieron para el caso de pretratamiento ácido.

En la figura 18 se presentan los perfiles de producción utilizando dicho sustrato en concentración del 2%. Dado que el contenido en celulosa de esta biomasa pretratada es de aproximadamente el 40%, los resultados de este proceso de producción habría que compararlos con aquéllos obtenidos sobre sustratos de referencia puros en concentración del 1% aproximadamente (tabla XII). Como se observa en dicha tabla, los rendimientos en proteínas extracelulares y actividades enzimáticas obtenidos no son desalentadores aunque la duración del proceso es mayor, debido a la dificultad que encuentra el micelio para crecer sobre este tipo de sustrato.

SUSTRATO	%	pH ini- cial.	Tiempo (horas)	Proteínas (mg/ml)	Actividades (UI/mg)	
					β -Glucosidasa	PF
Solka Floc	1	5.2	168	1,44	0,18	0,39
O.nervosum	2	5.4	288	2,54	0,06	0,40

TABLA XII. Influencia del tipo de sustrato en la producción de celulasas por *T.longibrachiatum* QM9414.

En este punto, es interesante hacer referencia a los problemas técnicos, que surgieron durante la producción de enzimas, y originados por la utilización en los medios de cultivo de sustratos insolubles. La aparición de espumas en los medios de producción fue uno de los mayores inconvenientes encontrados. Asimismo, la manipulación de los cultivos, toma de muestra, filtración final de los mismos, etc., se dificultó extraordinariamente debido a la naturaleza filamentosa de los hongos empleados y a la baja densidad de los sustratos lignocelulósicos.

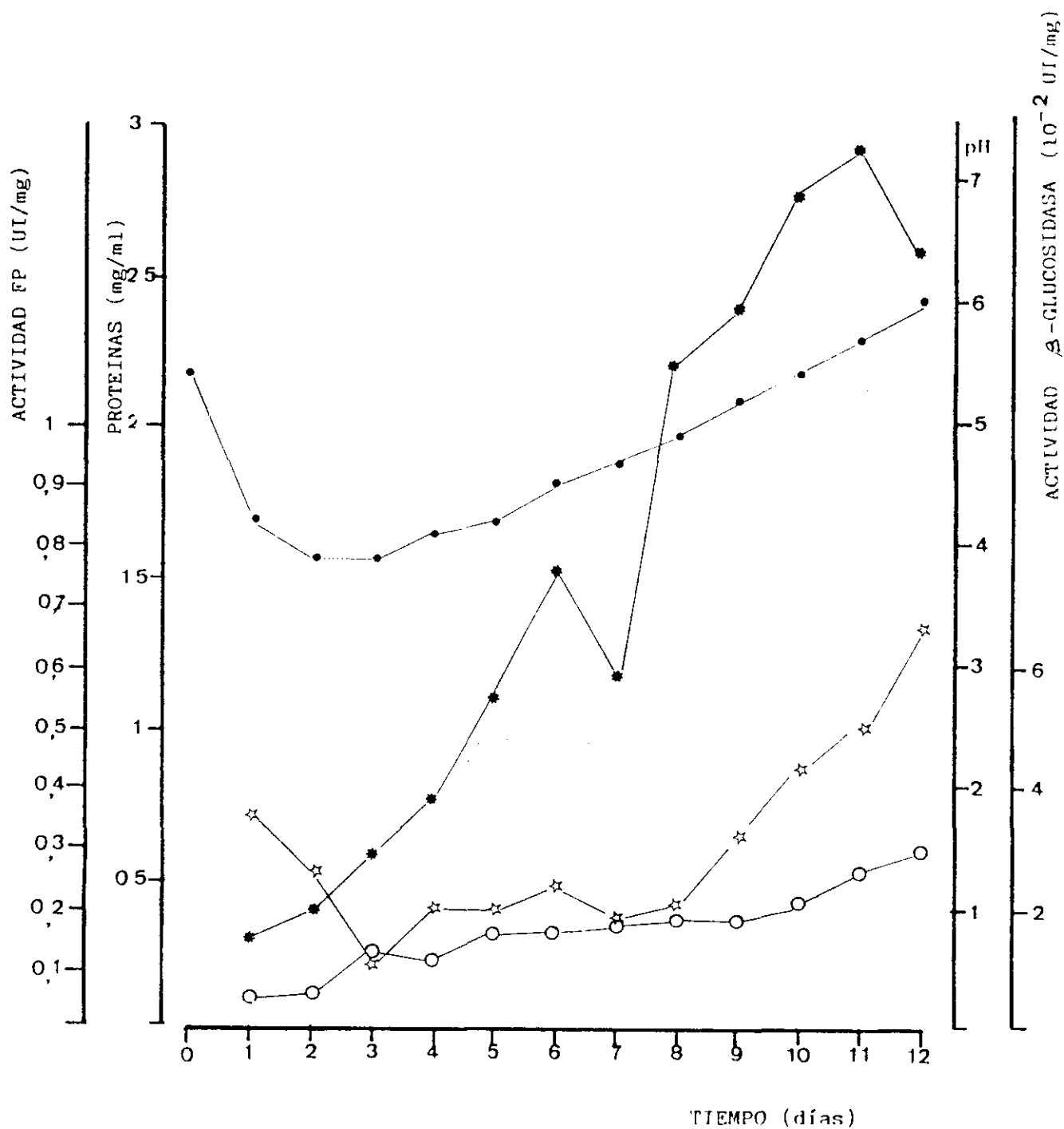


Figura 18. Cinética de producción de celulasas por *T. Longibrachiatum* QM9414 sobre 2% de *O. nervosum* sometido a pretratamiento ácido. Volumen total 2.5 litros. Evolución de (●) pH. (○) actividad sobre PF. (☆) actividad β-Glucosidasa. (*) proteínas extracelulares a lo largo de 12 días.

En función de los resultados obtenidos y expuestos anteriormente, se concluyó que el proceso llevado a cabo con Solka Floc al 2% era el más eficaz de los ensayados para producción de celulasas por *T.longibrachiatum*. Se eligió, por tanto, la fermentación en estas condiciones para la obtención del complejo que se utilizaría a lo largo del desarrollo del trabajo correspondiente a esta memoria.

A continuación, se recogen las características de la preparación enzimática empleada, obtenida por ultrafiltración, precipitación y liofilización del medio de cultivo de *T.longibrachiatum* QM9414 producido en fermentador de 9 litros. Se utilizó medio salino de Mandels con 2% de Solka Floc, 0,1% peptona y 0,1% Tween (temperatura 28°C y agitación 300-400 rpm).

proteínas (%)	95
Absorbancia a 280 nm.	1,4
(0,1% p/v)	
UI/mg (PF)	0,63
UI/mg (pNPG)	0,37
UI/mg(CMC)	17

4.1.2. Caracterización del complejo enzimático.

El rendimiento de un proceso de hidrólisis enzimática viene determinado por una serie de factores que atañen a la naturaleza del sustrato, a las características de la preparación enzimática empleada y a las condiciones en que se desarrolla el proceso de hidrólisis elegido. En este apartado, se recoge el estudio efectuado sobre la influencia de diversos factores en la eficacia con la que la preparación enzimática obtenida y cuyas características se recogen en el apartado anterior, hidroliza sustratos celulósicos de diferente origen, con objeto de fijar las condiciones óptimas del proceso utilizando dichas enzimas.

4.1.2.1. Influencia del pH y la temperatura.

Puesto que el valor del pH del medio y la temperatura influyen decisivamente en el comportamiento de las enzimas, fueron éstas las primeras condiciones que se ensayaron dentro de un rango elegido de acuerdo con los resultados publicados anteriormente.

Las condiciones óptimas para la actividad del complejo enzimático de *Trichoderma Longibrachiatum* QM9414 se estudiaron utilizando como sustrato para la hidrólisis Solka Floc HW-200 por ser éste un sustrato celulósico puro. Para el estudio de la influencia del pH se probaron valores comprendidos entre 3,8 y 6,3 y para el caso de la temperatura entre 30° y 55°C. La hidrólisis se llevó a cabo durante un período de tiempo de 4 horas para evitar problemas de inhibición que podrían originarse como consecuencia de la acumulación de los productos de hidrólisis durante períodos largos. Para la realización de estas experiencias se utilizó una actividad enzimática por gramo de sustrato de 18 UIPF y una relación sólido-líquido en el medio de reacción (tampón citrato 0,05M) del 5% (p/v). La tasa de hidrólisis se evaluó a partir de los azúcares reductores y la glucosa solubilizados en el hidrolizado resultante.

En las figuras 19 y 20 se muestran los resultados obtenidos con los diferentes pH y temperaturas ensayadas. Se observan en ambos casos que los pH superiores a 5 producen una clara disminución de la liberación de azúcares reductores y de glucosa. Puesto que la producción de azúcares informa de la actividad del conjunto de enzimas del complejo mientras que la glucosa lo hace más específicamente de la actividad de la β -glucosidasa, parece ser que esta última enzima es la más sensible a los valores altos de pH ya que la relación entre la glucosa y los azúcares reductores totales producidos (figura 21) disminuye conside-

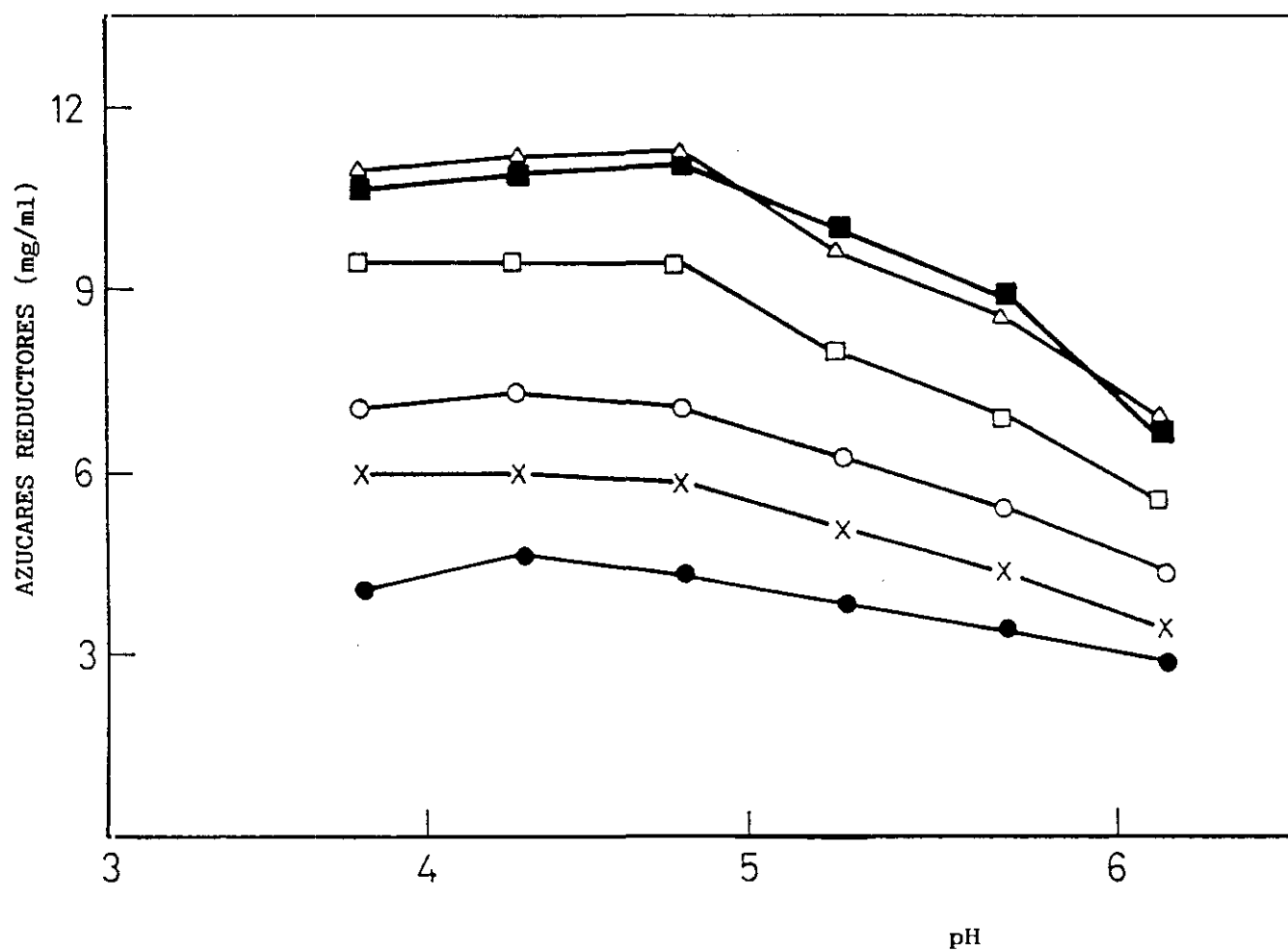


Figura 19: Efecto del pH en la hidrólisis enzimática del Solka Floc HW 200 a distintas temperaturas, expresado como azúcares reductores liberados: (●) 30°C. (x) 35°C. (o) 40°C. (□) 45°C. (Δ) 50°C y (■) 55°C.
 Tiempo de hidrólisis : 4 horas.
 Relación sólido-líquido (p/v) : 5%.

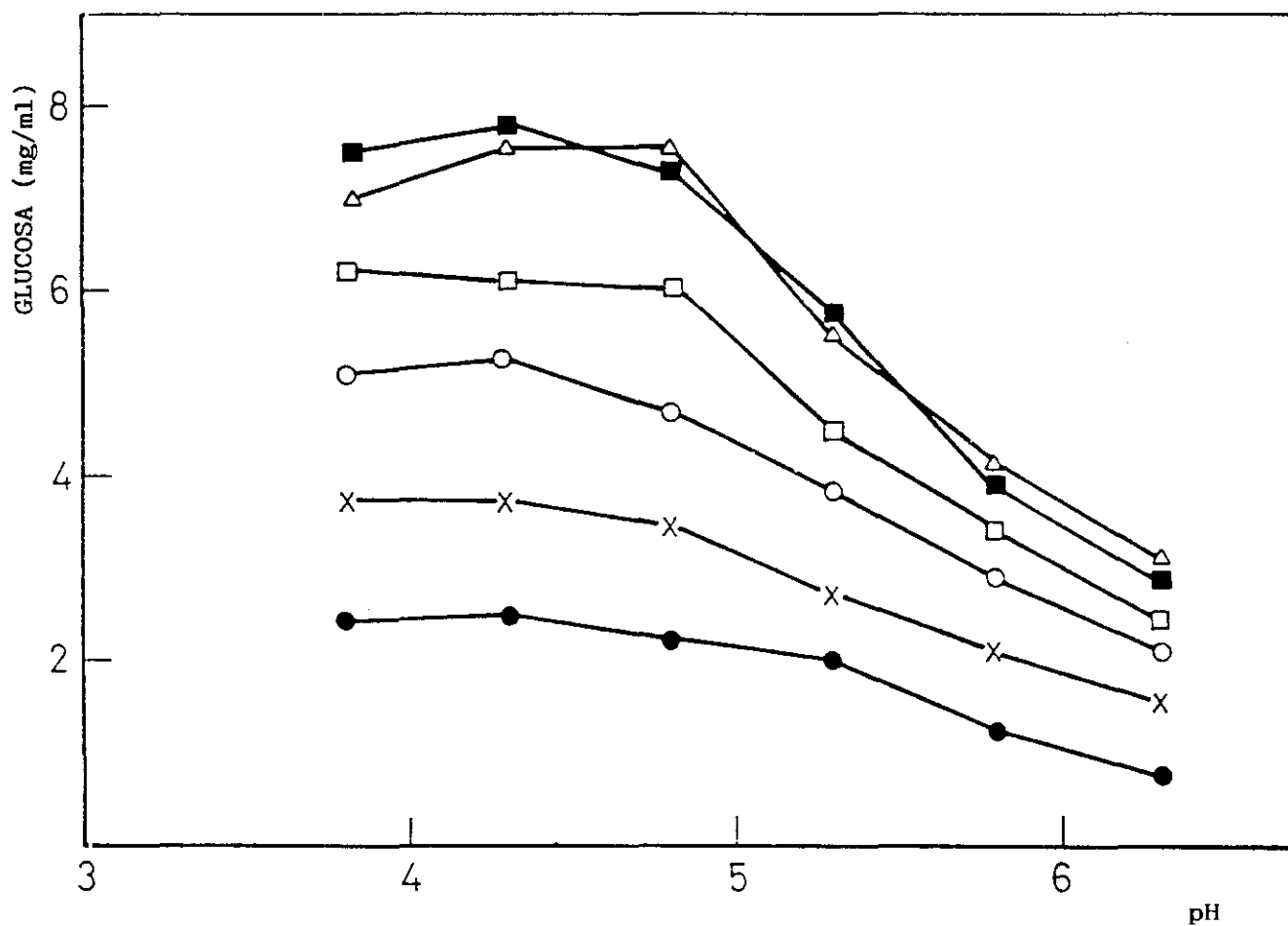


Figura 20: Efecto del pH en la hidrólisis enzimática del Solka Floc HW 200 a distintas temperaturas, expresado como glucosa liberada: (●) 30°C, (x) 35°C, (o) 40°C, (□) 45°C, (Δ) 50°C y (■) 55°C.
 Tiempo de hidrólisis : 4 horas.
 Relación sólido-líquido (p/v) : 5%.

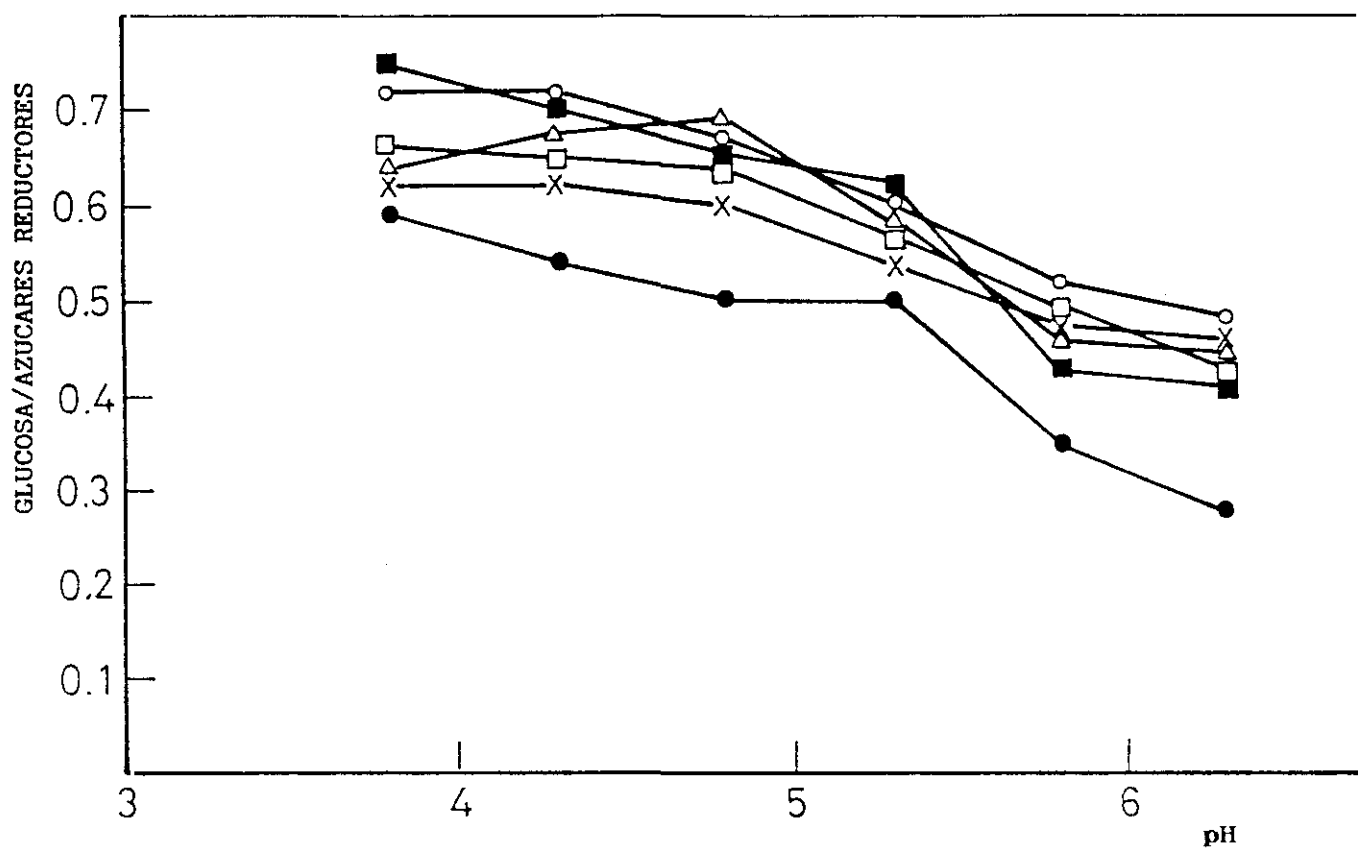


Figura 21: Efecto del pH en la hidrólisis enzimática del Solka Floc HW 200 a distintas temperaturas, expresado como relación entre glucosa y azúcares reductores liberados: (●) 30°C. (x) 35°C. (o) 40°C. (□) 45°C. (Δ) 50°C y (■) 55°C. Tiempo de hidrólisis : 4 horas. Relación sólido-líquido (p/v) : 5%.

blemente a medida que aumenta el pH del medio. De estos resultados se puede concluir que el valor de pH para el óptimo funcionamiento del complejo enzimático está comprendido entre 4,3 y 4,8. Puesto que el rango de pH óptimo es relativamente estrecho, la hidrólisis debería llevarse a cabo en medio tamponado, dado que según han descrito algunos autores el pH tiende a disminuir por efecto de la acción hidrolítica de las enzimas (Linko, 1977).

Con respecto a la temperatura se observa una mayor producción de reductores y glucosa cuando se eleva la misma alcanzándose los valores máximos entre 50° y 55° C (Figuras 19 y 20).

Paralelamente a la determinación de los azúcares reductores y de la glucosa solubilizados en el hidrolizado resultante, se evaluó la cantidad de proteínas solubles presentes en el medio después de 4 horas de hidrólisis. En la figura 22 están representados los valores de proteínas expresados como porcentaje del contenido inicial de proteínas en el medio de hidrólisis. Se observa que la máxima recuperación se produce a 50°C y pH 4,8; en este caso, el 60% de la concentración inicial fue recuperado, mientras que en las condiciones más desfavorables para la recuperación de proteínas, pH 3,8 y 30°C, solamente el 25% de la concentración inicial se encontraba en solución. Este mismo fenómeno ha sido observado por otros autores (Ryu y col., 1984).

Puesto que las condiciones óptimas de trabajo respecto a pH y temperatura coincidían con el mayor porcentaje de liberación de proteínas, se decidió efectuar en los ensayos sucesivos la hidrólisis del material celulósico en tampón citrato 0,05M a pH 4,8 y a 50°C.

4.1.2.2. Influencia de la concentración de sustrato y de enzima.

El estudio de la relación sólido-líquido y de la actividad enzimática por unidad de peso de sustrato, en el proceso de hidrólisis enzimática, es de gran importancia a la hora de fijar las condiciones óptimas del proceso. El conocimiento de las eficacias de hidrólisis en función de estas dos variables permitirán, por un lado, ajustar la cantidad de sustrato por volumen de mezcla al mínimo posible dentro del rango óptimo con objeto de obtener jarabes con alta concentración de azúcares, así como aquilatar el consumo de enzimas que como ya hemos comentado, supone uno de los factores que más encarece el proceso de hidrólisis.

Para llevar a cabo este estudio, se ha utilizado, como sustrato de la hidrólisis enzimática, biomasa lignocelulósica de *O.nervosum*, con objeto de evaluar los rangos óptimos de estos parámetros para el sustrato que será la materia prima a lo largo del trabajo aquí desarrollado. No obstante, los resultados obtenidos se compararon con los correspondientes al caso ideal de un sustrato celulósico puro como el Solka Floc. Debido a la baja susceptibilidad de la estructura lignocelulósica del *O.nervosum* a la acción enzimática, los ensayos que se recogen en este apartado, se llevaron a cabo también sobre *O.nervosum* sometido a

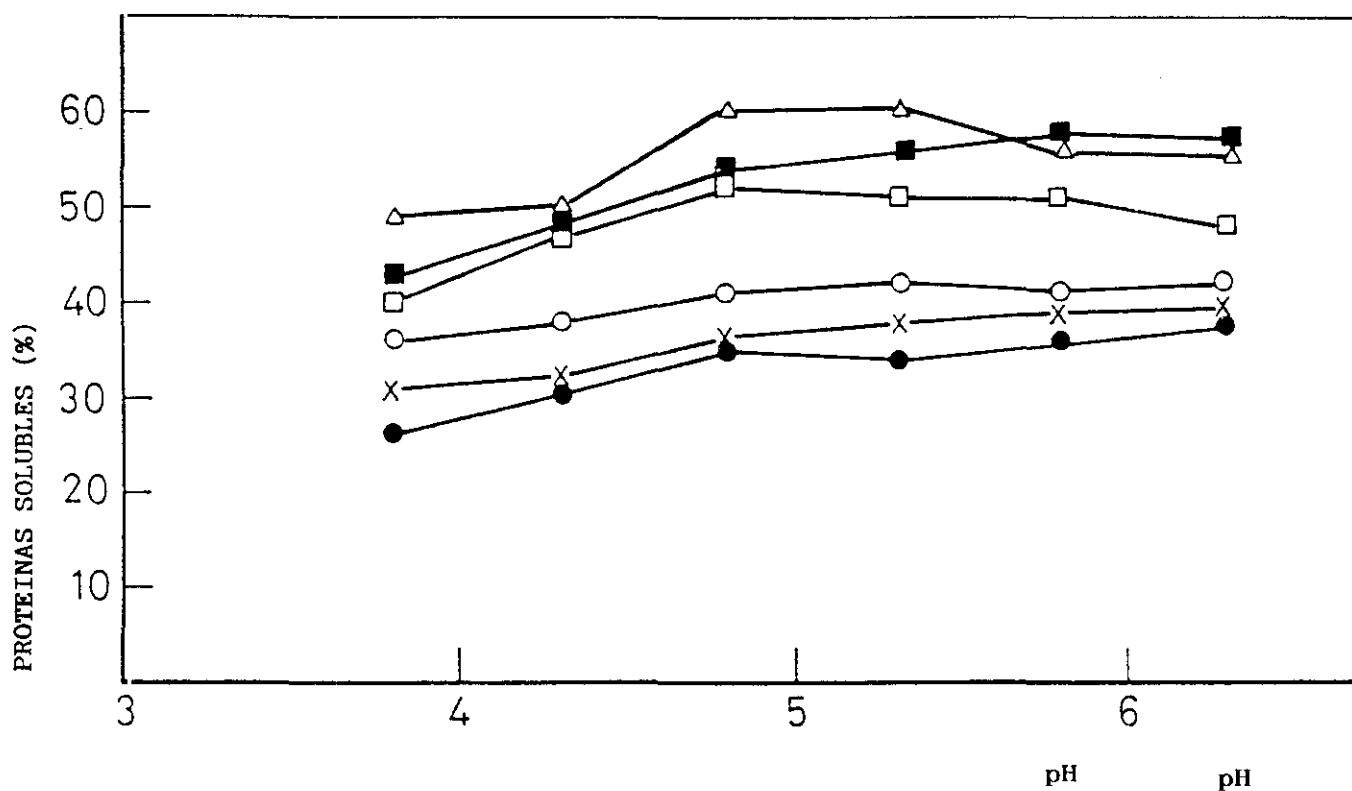


Figura 22: Efecto del pH en la hidrólisis enzimática del Solka Floc HW200 a distintas temperaturas en la recuperación de enzimas (expresado como porcentaje del valor inicial de proteínas en el medio de hidrólisis): (●) 30°C. (x) 35°C. (○) 40°C. (□) 45°C. (Δ) 50°C y (■) 55°C.
 Tiempo de hidrólisis : 4 horas.
 Relación sólido-líquido (p/v) : 5%.

diferentes pretratamientos. Puesto que este estudio se llevó a cabo con anterioridad a la evaluación de pretratamientos realizados en este trabajo y recogidos en la segunda parte de la memoria, los aquí empleados fueron seleccionados tomando como referencia algunos trabajos publicados sobre pretratamientos de sustratos lignocelulósicos, de composición similar a la del *O.nervosum*. Estos pretratamientos, pretratamiento oxidante con agua oxigenada al 1% (v/v) en medio alcalino y pretratamiento alcalino con NaOH al 1% (p/v), se describen en el apartado correspondiente del capítulo de Materiales y Métodos.

Tras algunos ensayos previos, se seleccionaron como valores de concentración de sólidos 5% y 10%. Debido a la baja densidad de los sustratos lignocelulósicos, valores más altos originarían problemas técnicos en la obtención de una buena mezcla que dificultarían la transferencia de las celulasas desde la fase líquida a la fase sólida. El rango de concentración de enzimas ensayado varió entre el 2% y el 8%, expresados como mg de proteína utilizada por cada 100 mg de sustrato (la actividad enzimática sobre papel de filtro y de β -glucosidasa por mg de proteína fue 0,63 UI y 0,3 UI respectivamente).

En las figuras 23, 24, 25 y 26 se representan los resultados obtenidos, expresados como mg de azúcares reductores solubilizados durante 48 horas de hidrólisis, con las diferentes proporciones de enzima, para los cuatro sustratos empleados.

En las figuras 27 y 28 se representan los valores obtenidos, a las 48 horas de hidrólisis, de azúcares reductores por unidad de actividad PF utilizado frente al valor de actividad enzimática empleada.

Comparando las distintas gráficas, se puede observar que cuando la concentración de sustrato en el medio de reacción se aumenta desde el 5% hasta el 10%, conservando la misma relación enzima-sustrato, el rendimiento de la hidrólisis, expresado como producción de azúcares reductores por unidad de peso de sustrato, se mantiene más o menos constante en todos los casos. Esto supone la posibilidad de obtener, utilizando la concentración del 10%, un hidrolizado con doble concentración de azúcares reductores sin perder eficiencia en el rendimiento de hidrólisis.

La influencia de la concentración de enzima en el rendimiento del proceso de hidrólisis queda reflejado en las figuras 23, 24, 25, 26, 27 y 28. En las dos últimas se recogen los valores de azúcares reductores producidos después de 48 horas de hidrólisis por gramo de celulosa en función de la proporción de proteína.

En el caso de los sustratos no tratados (Solka Floc y *O.nervosum*) se observa que para los valores más altos de actividad enzimática empleada se obtiene alrededor de un 60% de hidrólisis de la celulosa, expresada como azúcares reductores producidos por gramo de celulosa inicial (figura 27). La saturación del proceso hidrolítico puede ser debida a la propia estructura del sustrato cuyas zonas cristalinas son difícilmente atacables, en su estado nativo, por las enzimas, o a la acumulación de elevadas cantidades de glucosa y otros azúcares que actuarían inhibiendo la actividad de los distintos componentes del complejo.

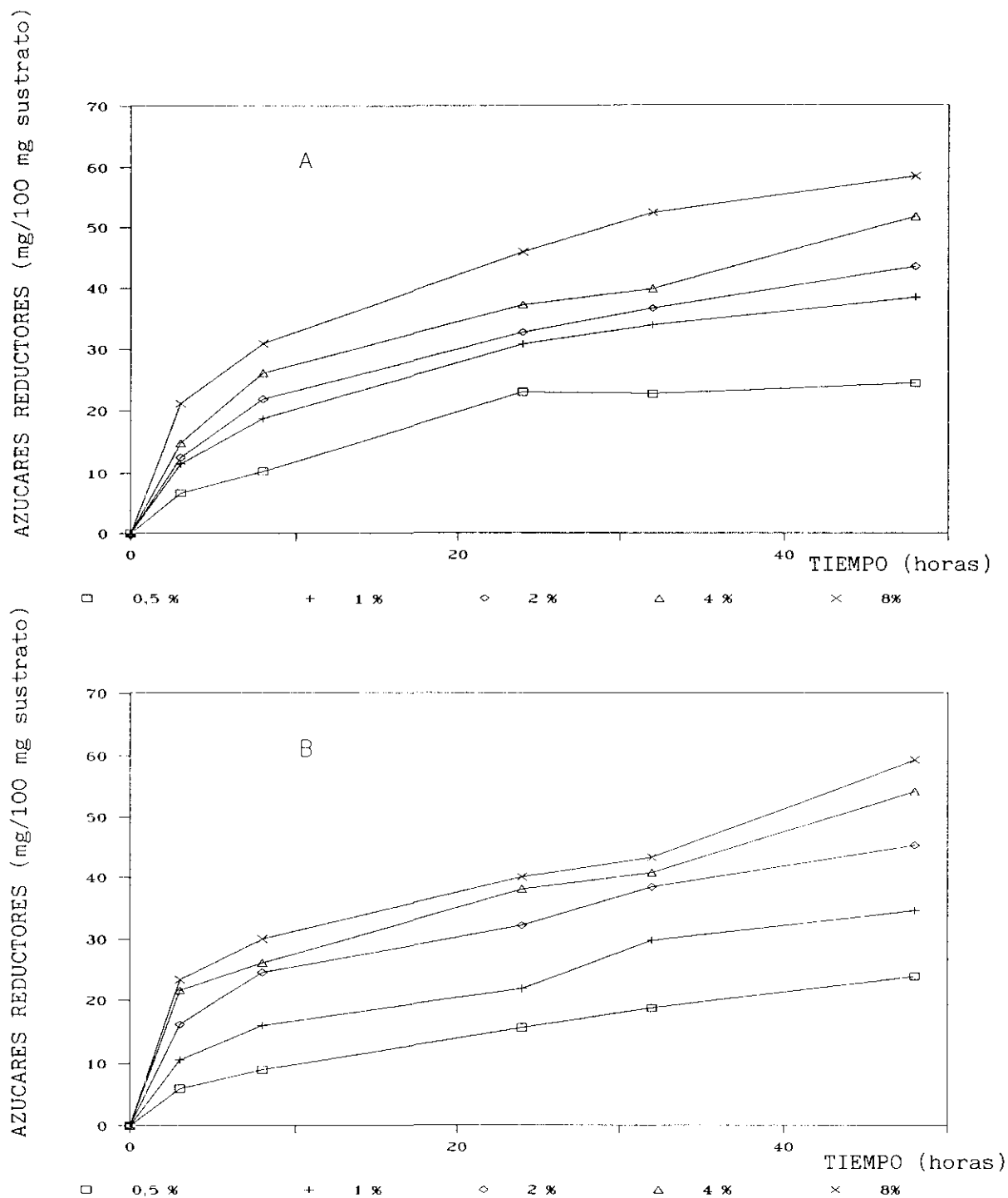


Figura 23: Efecto de la proporción de enzima (expresada como gramos de proteína por 100 g. de sustrato) en la producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de Solka Floc HW-200. Relación sólido-líquido: 5% (A) y 10% (B).

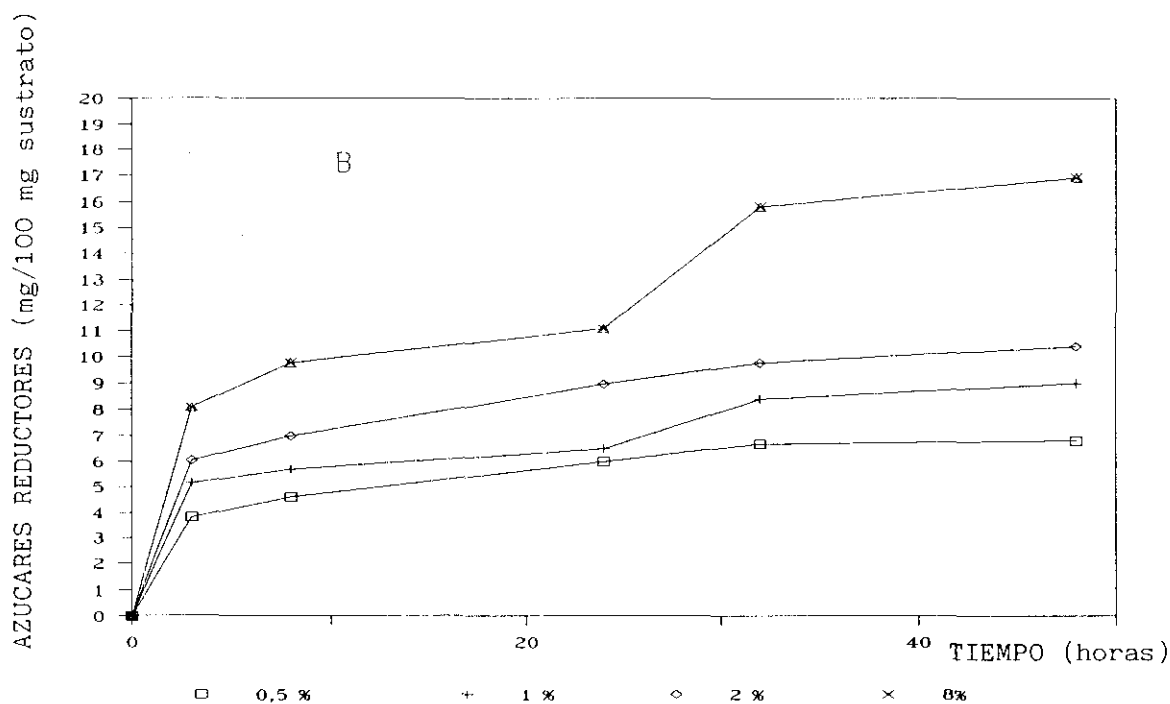
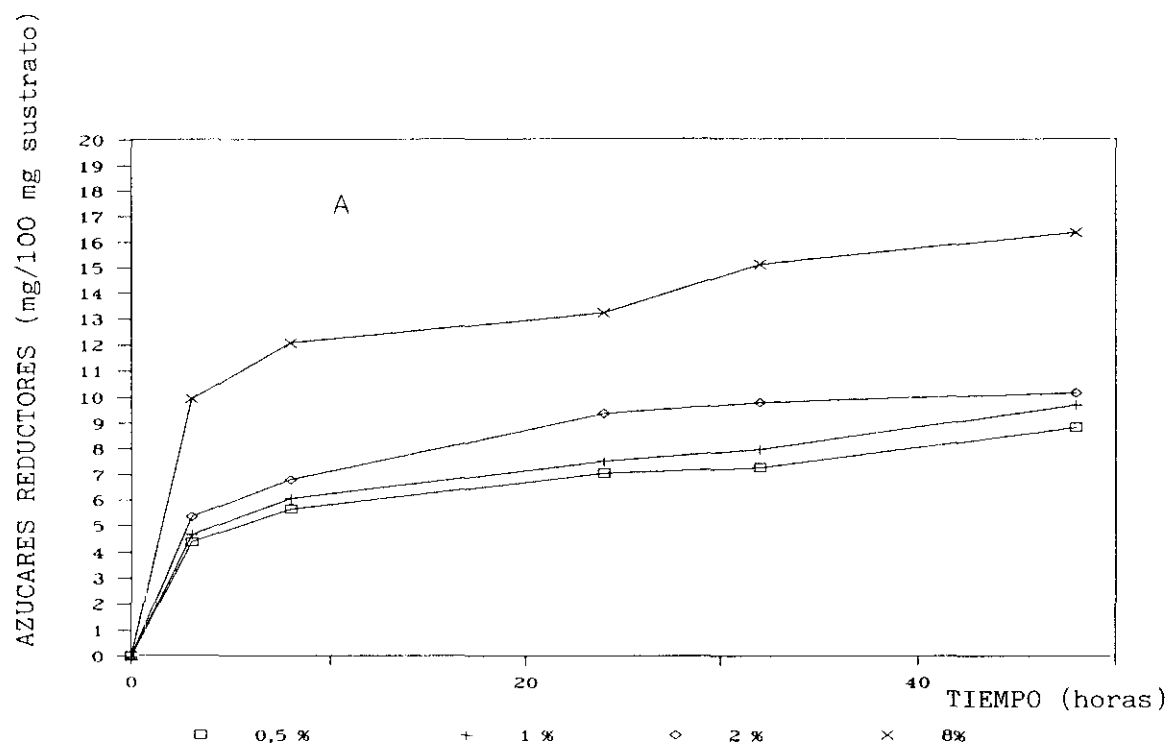


Figura 24: Efecto de la proporción de enzima (expresada como gramos de proteína por 100 g. de sustrato) en la producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de *O.nervosum* nativo. Relación sólido-líquido: 5 % (A) y 10 % (B).

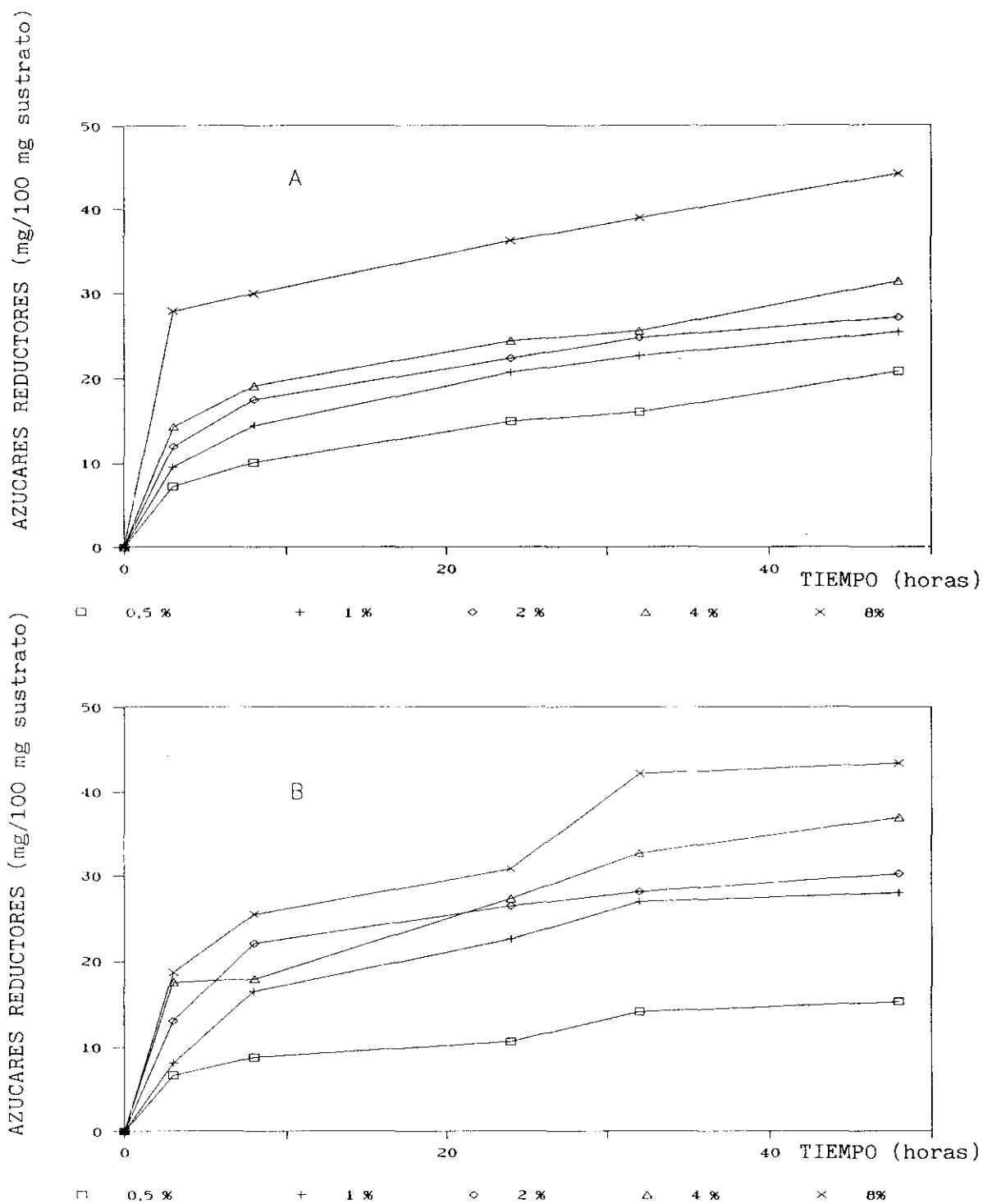


Figura 25: Efecto de la proporción de enzima (expresada como gramos de proteína por 100 g. de sustrato) en la producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de *O.nervosum* pretratado con H_2O_2 en medio básico. Relación sólido-líquido: 5% (A) y 10% (B).

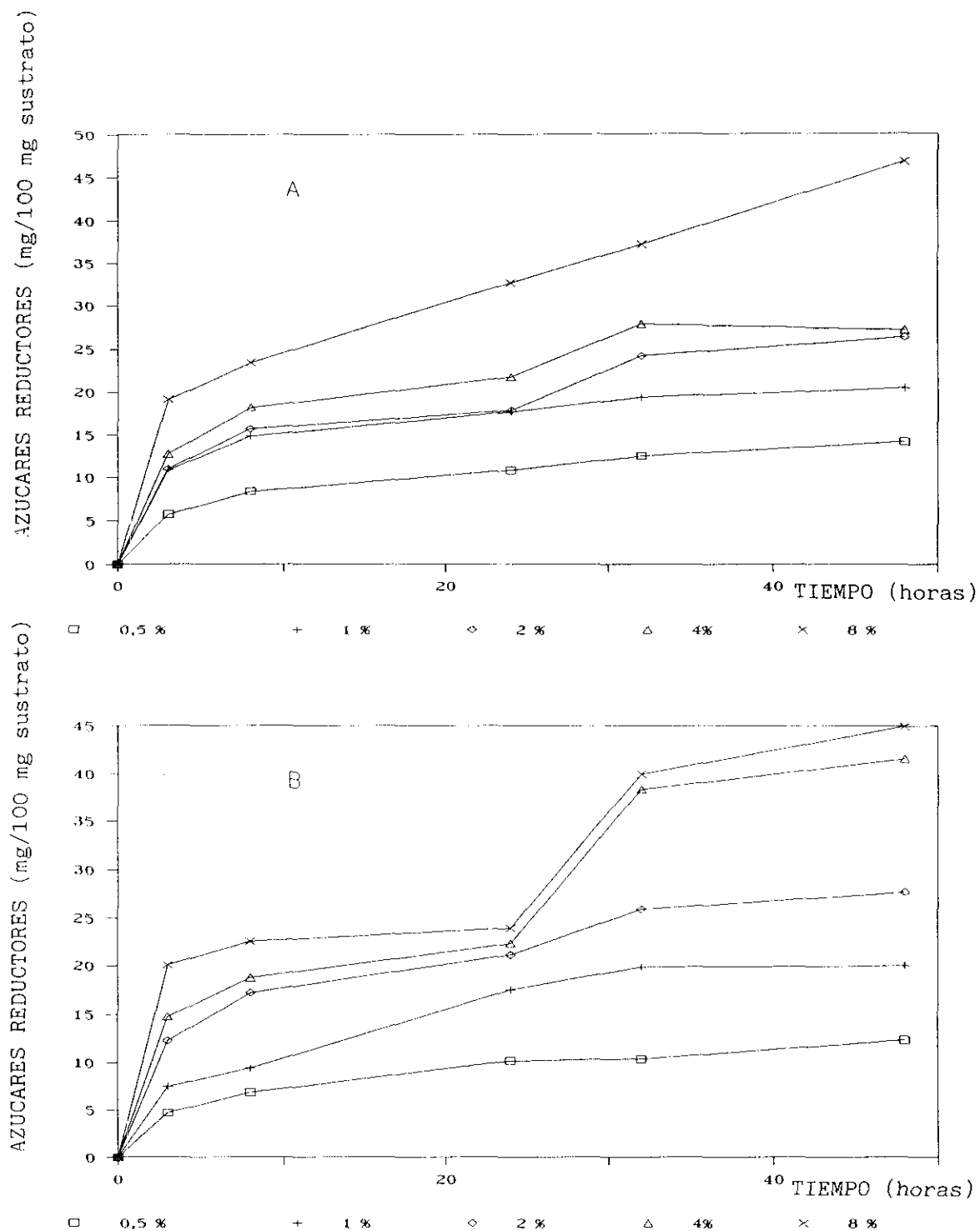


Figura 26: Efecto de la proporción de enzima (expresada como gramos de proteína por 100 g. de sustrato) en la producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de *O.nervosum* pretratado con NaOH. Relación sólido-líquido: 5% (A) y 10% (B).

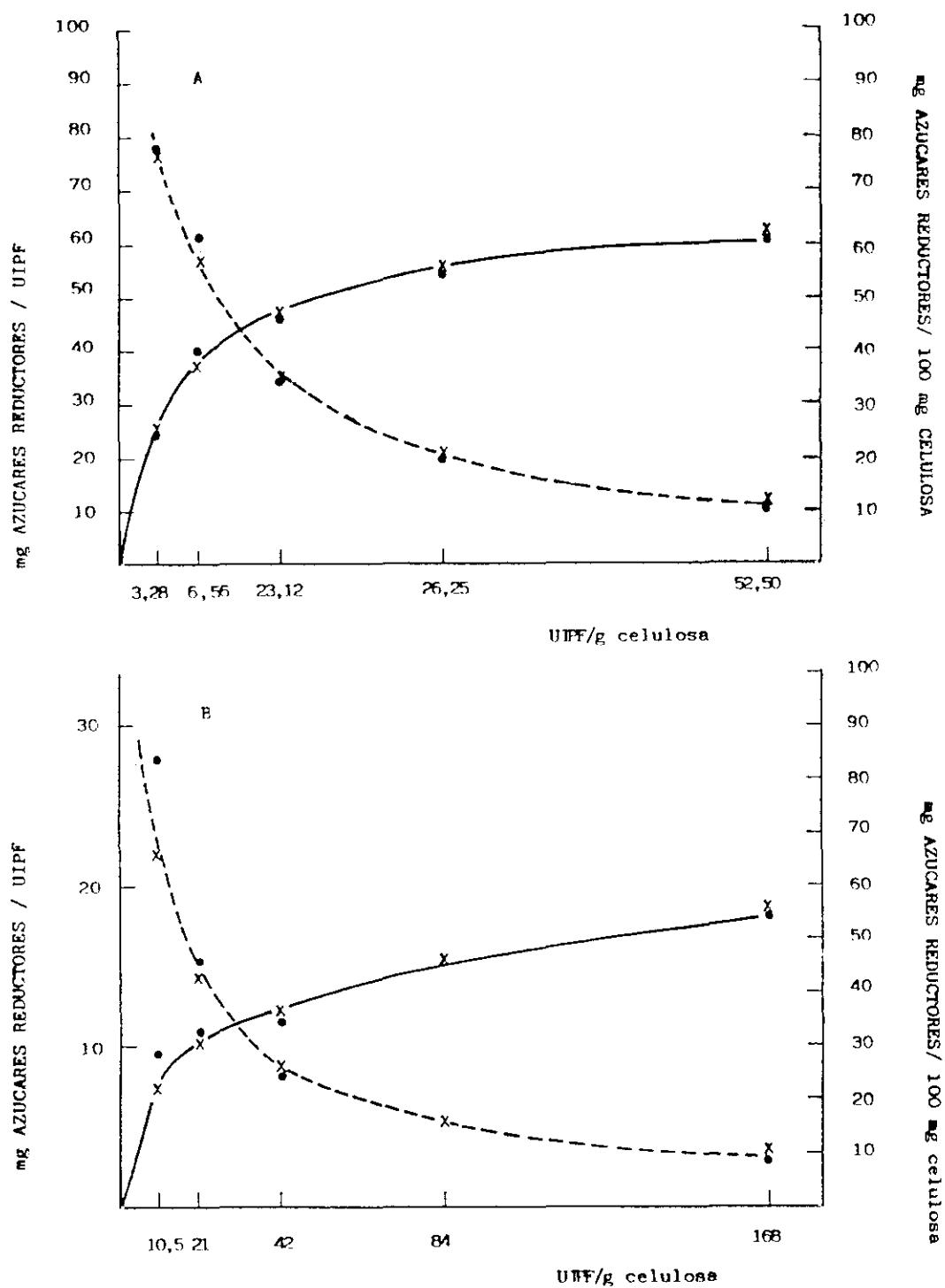


Figura 27. Eficacia del complejo celulolítico (mg. azúcares reductores/UIPF) (---) y rendimiento de la hidrólisis (mg. azúcares reductores/100 mg celulosa) (—) en función de la relación enzima-sustrato (UIPF/g.celulosa inicial).
 Tiempo de hidrólisis: 48 horas.
 Relación sólido-líquido: (●) 5% y (x) 10%.
 Sustrato: (A) Solka Floc HW-200 y (B) O. nervosum nativo.

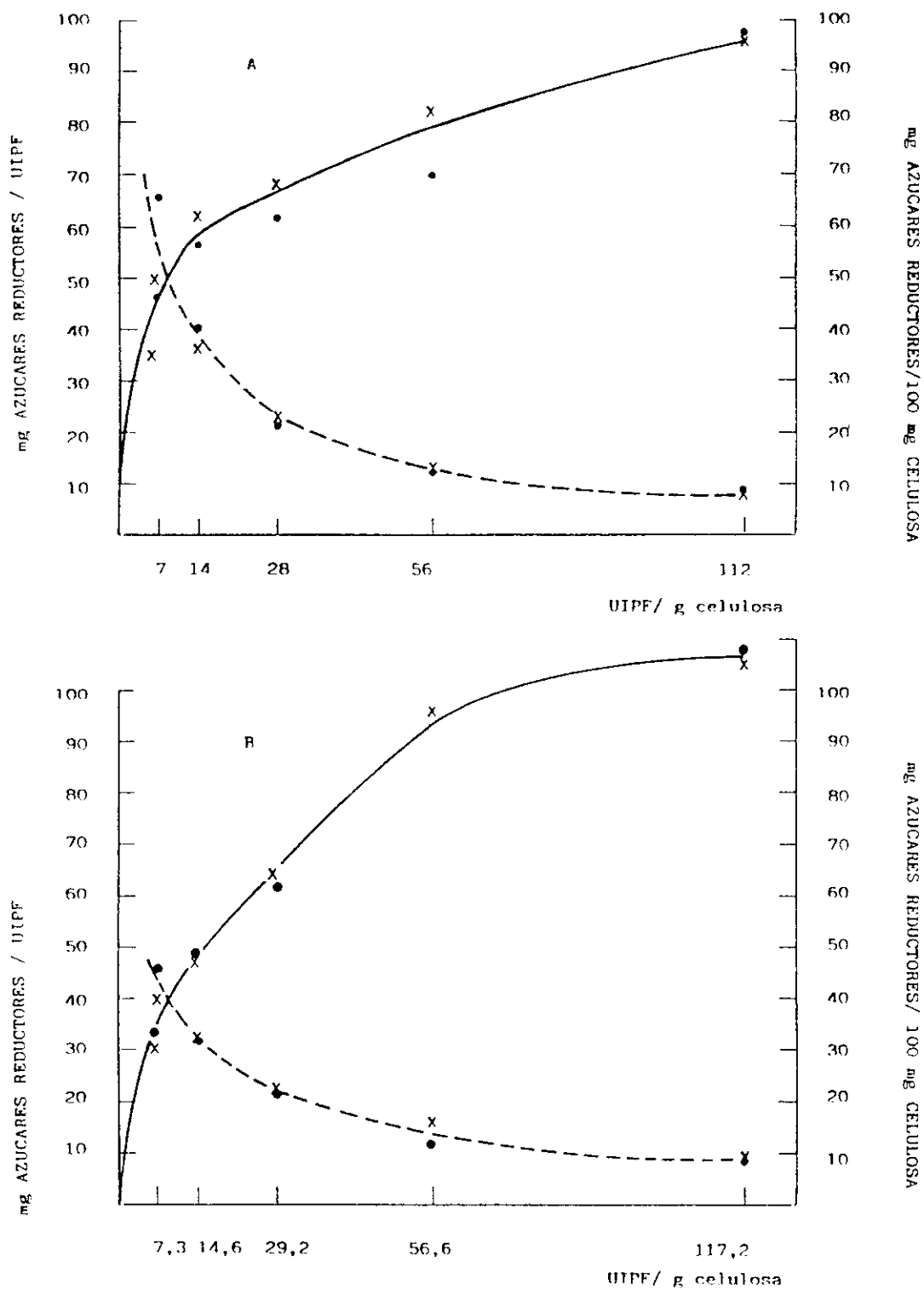


Figura 28. Eficacia del complejo celulolítico (mg. azúcares reductores/UIPF) (---) y rendimiento de la hidrólisis (mg. azúcares reductores/100 mg celulosa) (—) en función de la relación enzima-sustrato (UIPF/g.celulosa inicial). Tiempo de hidrólisis: 48 horas. Relación sólido-líquido: (●) 5% y (x) 10%. Sustrato: (A) *O. nervosum* pretratado con H₂O₂ en medio básico y (B) *O. nervosum* pretratado con NaOH.

Con los sustratos pretratados (figura 28) se consigue para las actividades más altas rendimientos cercanos al 100% (expresados como azúcares reductores producidos por gramo de celulosa inicial), con lo cual se demuestra la capacidad de los pretratamientos para modificar la estructura de los sustratos haciéndolos más accesibles a las enzimas hidrolíticas.

En general, se observa que alrededor del 70% del máximo de hidrólisis conseguida se obtiene para valores entre 2% y 4% de enzima, siendo necesario aumentar de 2 a 4 veces la concentración de enzima para conseguir el 30% restante. Estos datos han servido como base a la hora de fijar las actividades enzimáticas por gramo de sustrato (20 UIPF/g. sustrato) en los estudios comparativos posteriores de la eficacia de pretratamiento sobre el rendimiento de la hidrólisis.

Estos resultados deben tenerse en cuenta a la hora de diseñar procesos de hidrólisis y decidir si resulta más interesante, desde el punto de vista técnico y económico, utilizar mayor actividad de enzimas para obtener valores más altos de hidrólisis y por tanto, hidrolizados más concentrados con vistas a fermentaciones posteriores, o el elevado coste de las enzimas aconseja su utilización en menor proporción a pesar de que el rendimiento final disminuya.

El pretratamiento de la materia lignocelulósica previo a la hidrólisis con enzimas tiene una influencia decisiva en el rendimiento de la misma. Puesto que los pretratamientos utilizados en este caso fueron, seleccionados en base a datos de bibliografía sin que se realizaran estudios de optimización de los mismos para la biomasa de *O.nervosum*, es de gran interés la evaluación de la efectividad de diversos pretratamientos en función de su incidencia en el rendimiento de la hidrólisis enzimática y en el coste global del proceso de transformación. Por este motivo, en la segunda parte correspondiente a esta memoria se ha hecho especial hincapié en el estudio del efecto de diferentes pretratamientos para la biomasa de *Onopordum nervosum* en el rendimiento de la hidrólisis.

4.1.2.3. Estabilidad del complejo enzimático.

Dado que la temperatura óptima de acción de las enzimas celulolíticas es elevada y que el proceso de hidrólisis debe llevarse a cabo durante un período largo de tiempo, es importante conocer la estabilidad de la actividad enzimática de la preparación, a la temperatura seleccionada como óptima, por si fuera necesario contrarrestar las posibles pérdidas de actividad durante dicho proceso con adiciones sucesivas de enzima.

En nuestro caso, la estabilidad de la actividad del complejo ha sido evaluada en solución, en condiciones similares a las del proceso de hidrólisis, y a la temperatura de 50°C seleccionada previamente como óptima. Los ensayos de termoestabilidad han sido llevados a cabo durante 96 horas, con el fin de cubrir sobradamente la duración típica de un proceso de hidrólisis enzimática (24-48 horas).

En la figura 29, en la que se representan los valores de la actividad sobre papel de filtro y de la β -glucosidasa en las condiciones descritas, se observa que ésta última se mantiene más o menos constante durante este periodo y que la actividad sobre papel de filtro disminuye a partir de las 48 horas en aproximadamente un 25% del valor inicial.

En la bibliografía, se describen diferentes grados de desactivación térmica para preparaciones celulolíticas procedentes de diferentes microorganismos. Así, por ejemplo, la β -glucosidasa producida por *Coriolus versicolor*, cuyo pH y temperatura óptima de actuación son 4,3 y 45°C respectivamente, cuando se incuba a 45°C pierde el 50% de la actividad inicial al cabo de 20 horas y el 55% después de 45 horas de incubación. (Evans, 1985).

Rodríguez y col. (1988) describen para las enzimas celulolíticas producidas por bacterias del género *Cellulomonas*, cuando se incuban en las condiciones óptimas de pH y temperatura, una pérdida del 77% de la actividad sobre papel de filtro y del 90% de la actividad β -glucosidasa al cabo de 24 horas de incubación.

Según Saddler y col. quienes han estudiado la estabilidad térmica de las actividades endoglucanasa, β -glucosidasa y sobre papel de filtro de *Trichoderma harzianus* (1985), la vida media para las actividades de dichas enzimas es de alrededor de 15 horas en el caso de la actividad PF y mucho menor para el caso de la actividad β -glucosidasa. Utilizando el mismo microorganismo, Macris y Galiotou-Panayoton (1986) encontraron valores de vida media para la actividad β -glucosidasa de 1,1 días a 50°C.

Por el contrario, la β -glucosidasa de *Aspergillus niger* presenta bastante estabilidad cuando se mantiene a 50°C y pH 5 durante prolongados tiempos de incubación. En estas condiciones, más del 85% de la actividad se retiene después de 48 horas y el 22% después de 120 horas (Dekker, 1986).

La β -glucosidasa de *Alternaria alternata* presenta también elevada termoestabilidad (vida media de 3,5 días, 1,8 horas y 10 minutos a 60°, 65° y 70°C respectivamente) (Macris, 1984).

En nuestro caso, los resultados obtenidos muestran una buena estabilidad enzimática bajo las condiciones de hidrólisis, particularmente la β -glucosidasa, la cual permanece prácticamente constante después de 96 horas de incubación.

4.1.2.4. Estudios de inhibición por glucosa, celobiosa y etanol.

Se ha estudiado el comportamiento del complejo enzimático en la hidrólisis del *Onopordum nervosum* en función de la concentración en el medio de productos finales de hidrólisis como celobiosa y glucosa, así como de etanol, en previsión del comportamiento de las enzimas celulolíticas en un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación. Los

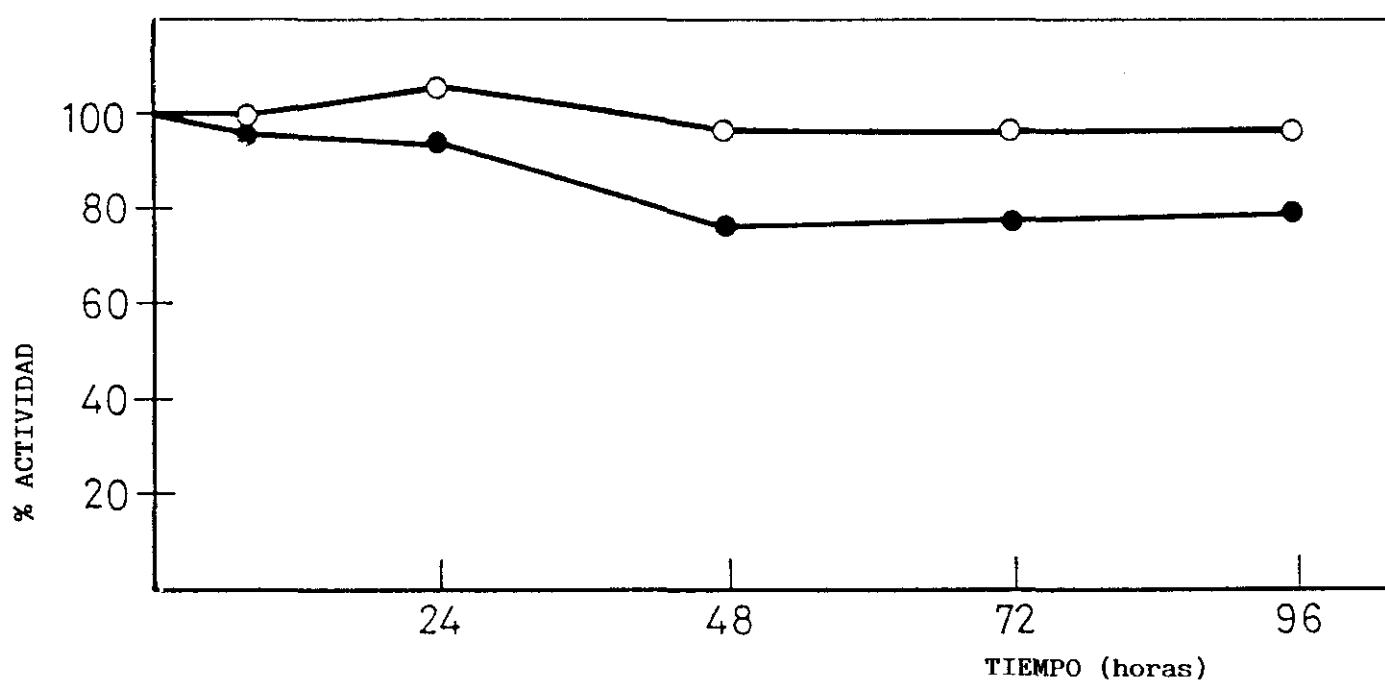


Figura 29: Variación de las actividades enzimáticas: (○) β -glucosidasa y (●) sobre papel de filtro, en función del tiempo de incubación, a 50°C, del complejo enzimático producido por Trichoderma longibrachiatum QM9414.

resultados obtenidos (figura 30) muestran un aumento de la inhibición a medida que aumenta la concentración de estos productos en el medio, así por ejemplo, con una concentración de 5 mg/ml de glucosa la inhibición alcanzó el 10% mientras que a partir de 10 mg/ml ésta fue superior al 60%. En el caso de la adición de celobiosa, los resultados ponen de manifiesto la disminución en la producción de este disacárido probablemente debido a la inhibición de la CBH. En cuanto a la inhibición por etanol de la producción de glucosa se observa que es proporcionalmente mucho menor que la producida por una cantidad de glucosa equivalente (cantidad de glucosa que produciría por fermentación esa concentración de etanol) lo cual favorecería los procesos de fermentación simultáneos a la hidrólisis, en la que la glucosa puede ser retirada del medio por acción de los microorganismos fermentativos y transformada a etanol.

Para estudiar más detalladamente el efecto de la acumulación de los productos de hidrólisis y la posibilidad de aumentar el rendimiento de la misma aumentando la concentración de enzimas o procediendo a retirar los productos del medio se realizaron sobre Solka Floc, *O.nervosum* nativo y pretratado una serie de ensayos que se recogen a continuación.

El objeto de este estudio ha sido evaluar la capacidad máxima de hidrólisis del complejo enzimático obtenido de *T.longibrachiatum* en ausencia de fenómenos de inhibición y utilizando concentraciones elevadas de enzima. Los tres tipos de ensayos se realizaron de acuerdo a las siguientes estrategias:

- I. Hidrólisis con una única dosis de enzima (20 UIPF/g sustrato), sin retirada de productos de hidrólisis.
- II. Hidrólisis con tres dosis de enzima (20UI/g sustrato x 3), añadidas cada 24 horas previa separación de productos de hidrólisis.
- III. Hidrólisis con tres dosis de enzima (20UI/g sustrato x 3), añadidas cada 24 horas sin retirada de productos de hidrólisis.

Las diferentes estrategias para estudiar el comportamiento hidrolítico del complejo enzimático se recogen en la figura 31.

Los resultados obtenidos se recogen en las figuras 32 y 33.

De estos resultados se desprenden las siguientes consideraciones:

- En el caso de sustrato nativo no hay diferencias considerables debido a que el factor limitante de la hidrólisis es la propia estructura del sustrato.

- Para el resto de los sustratos estudiados el ensayo de tipo II es el que produce mejores resultados debido a la eliminación del medio de reacción de los productos de hidrólisis que actúan como inhibidores del proceso.

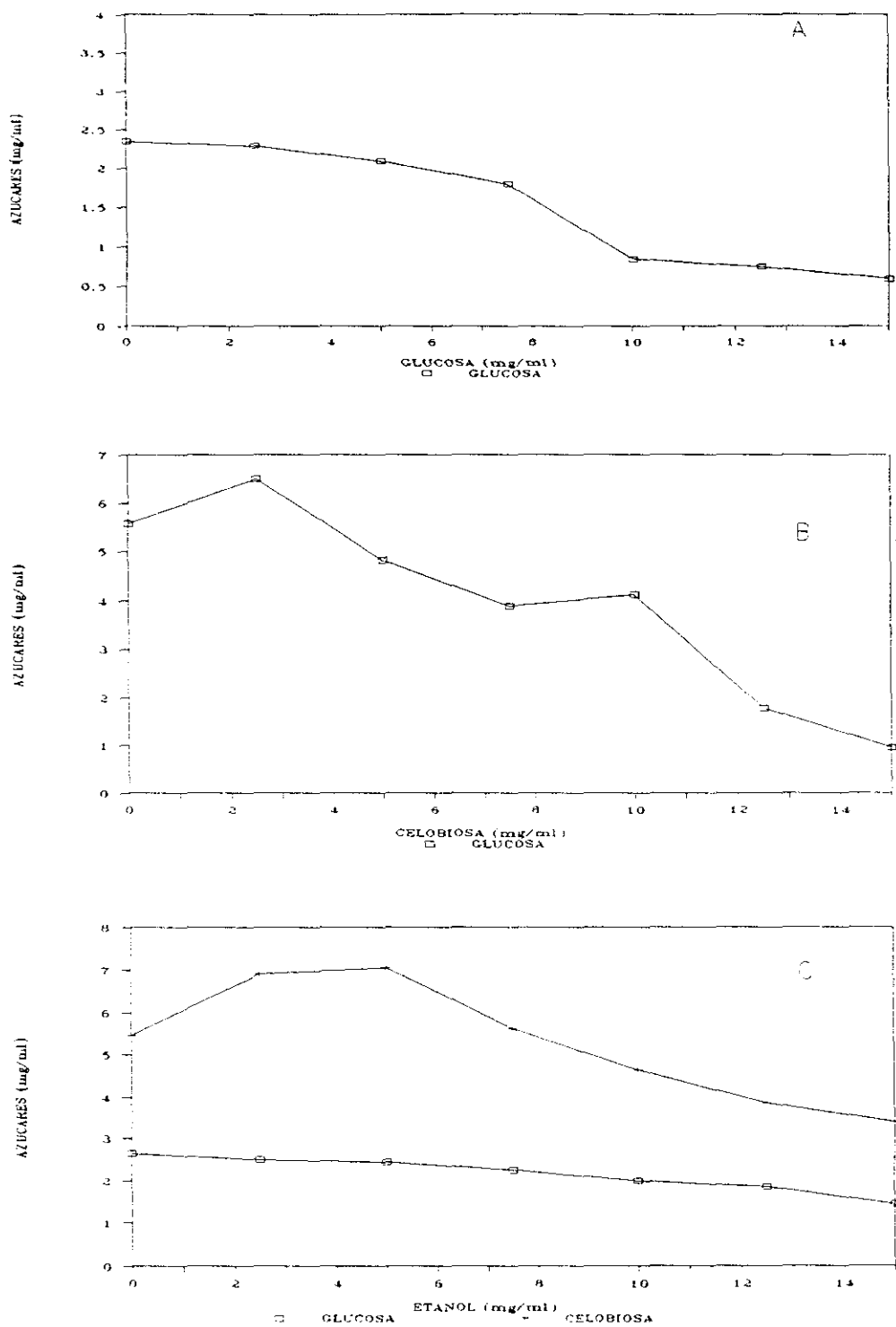
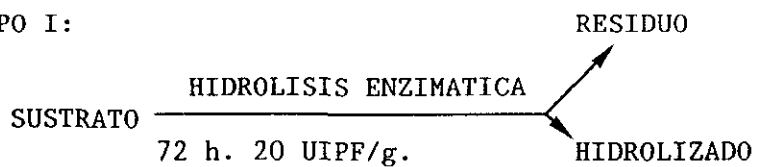


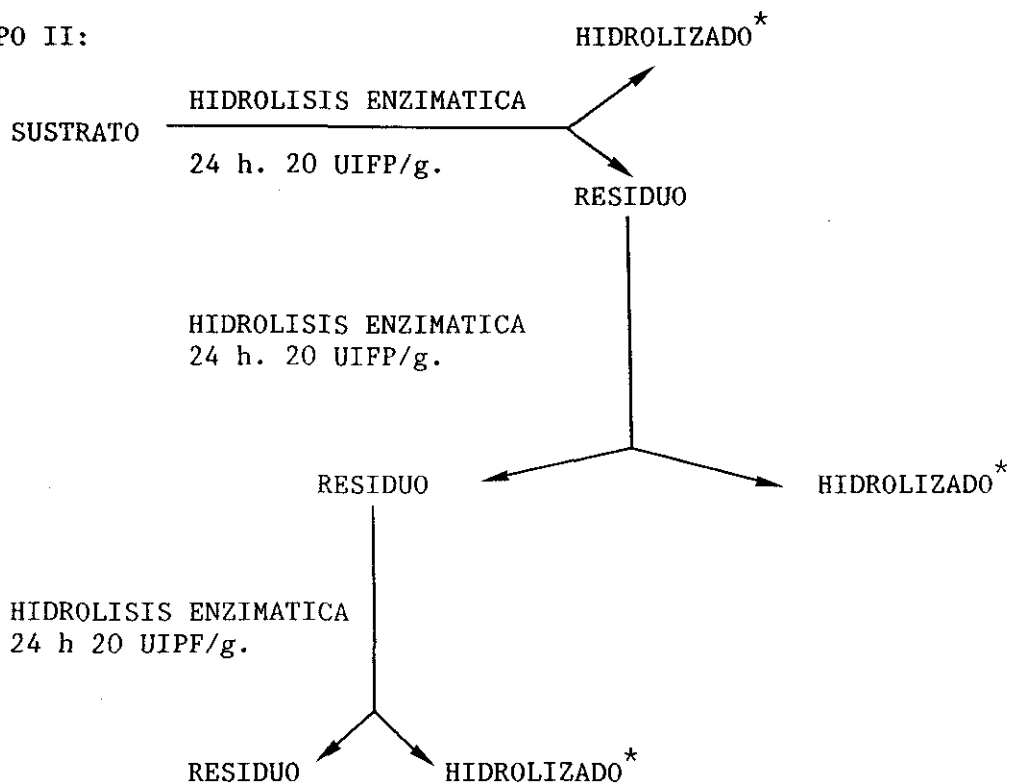
Figura 30 Efecto de la adición de : (A) glucosa, (B) celobiosa y (C) etanol, en la producción de azúcares por hidrólisis enzimática del *O. nervosum*.

ENSAYO TIPO I:

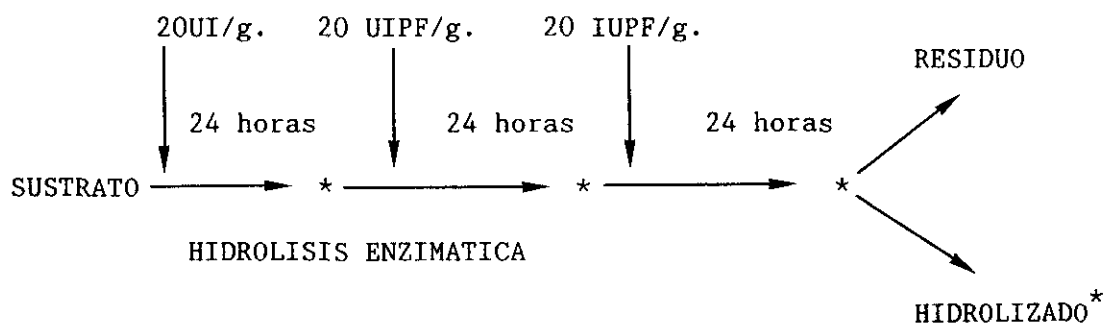


En este ensayo se realizaron análisis de glucosa y reductores cada 24 horas.

ENSAYO TIPO II:



ENSAYO TIPO III:



* análisis de glucosa y azúcares reductores.

Figura 31: Diferentes estrategias para estudiar el comportamiento hidrolítico del complejo enzimático.

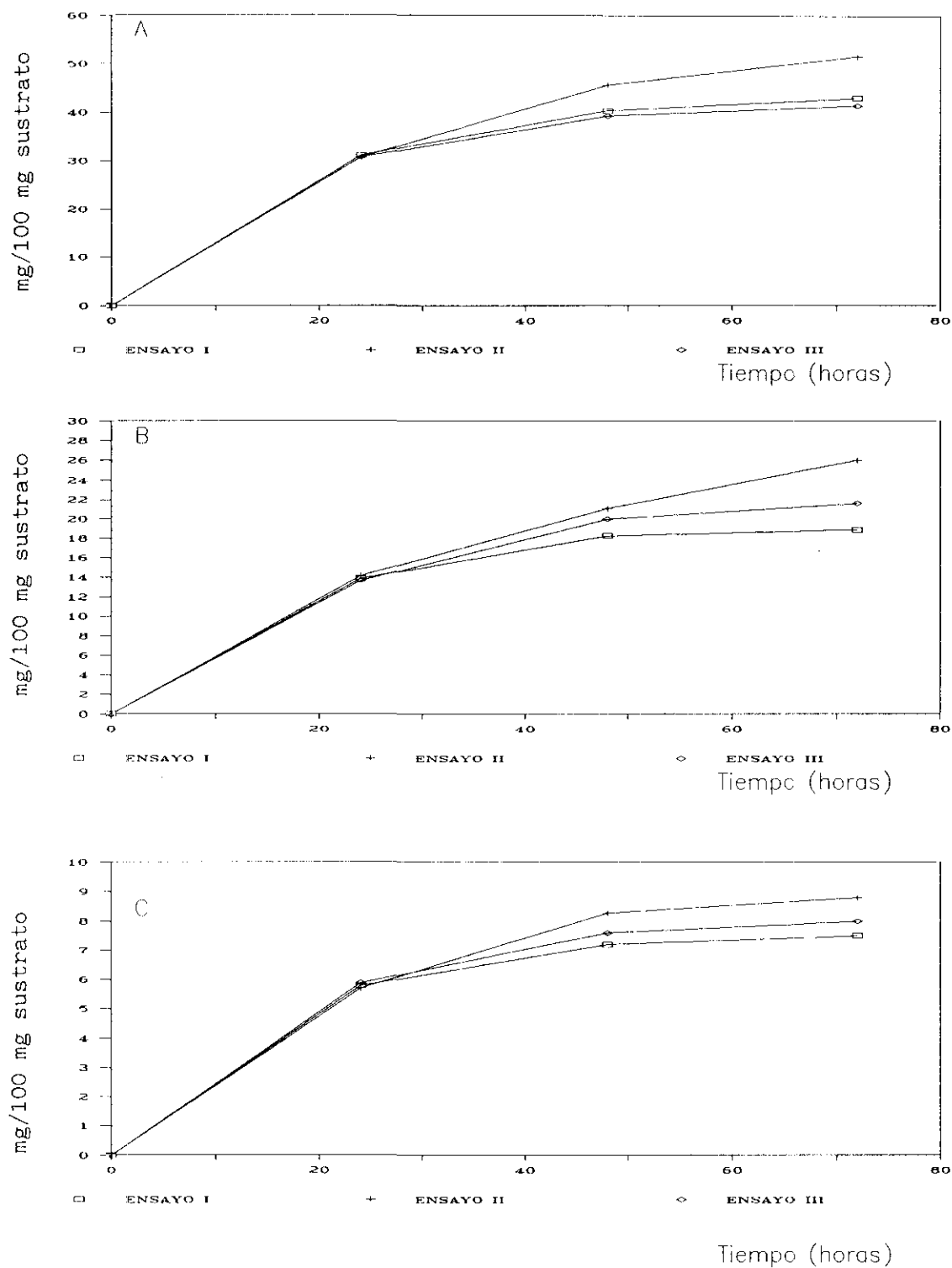


Figura 32: Producción de glucosa por hidrólisis enzimática.
Sustratos: (A) Solka Floc HW-200, (B) *O.nervosum* pretratado y (C) *O.nervosum* sin tratar.

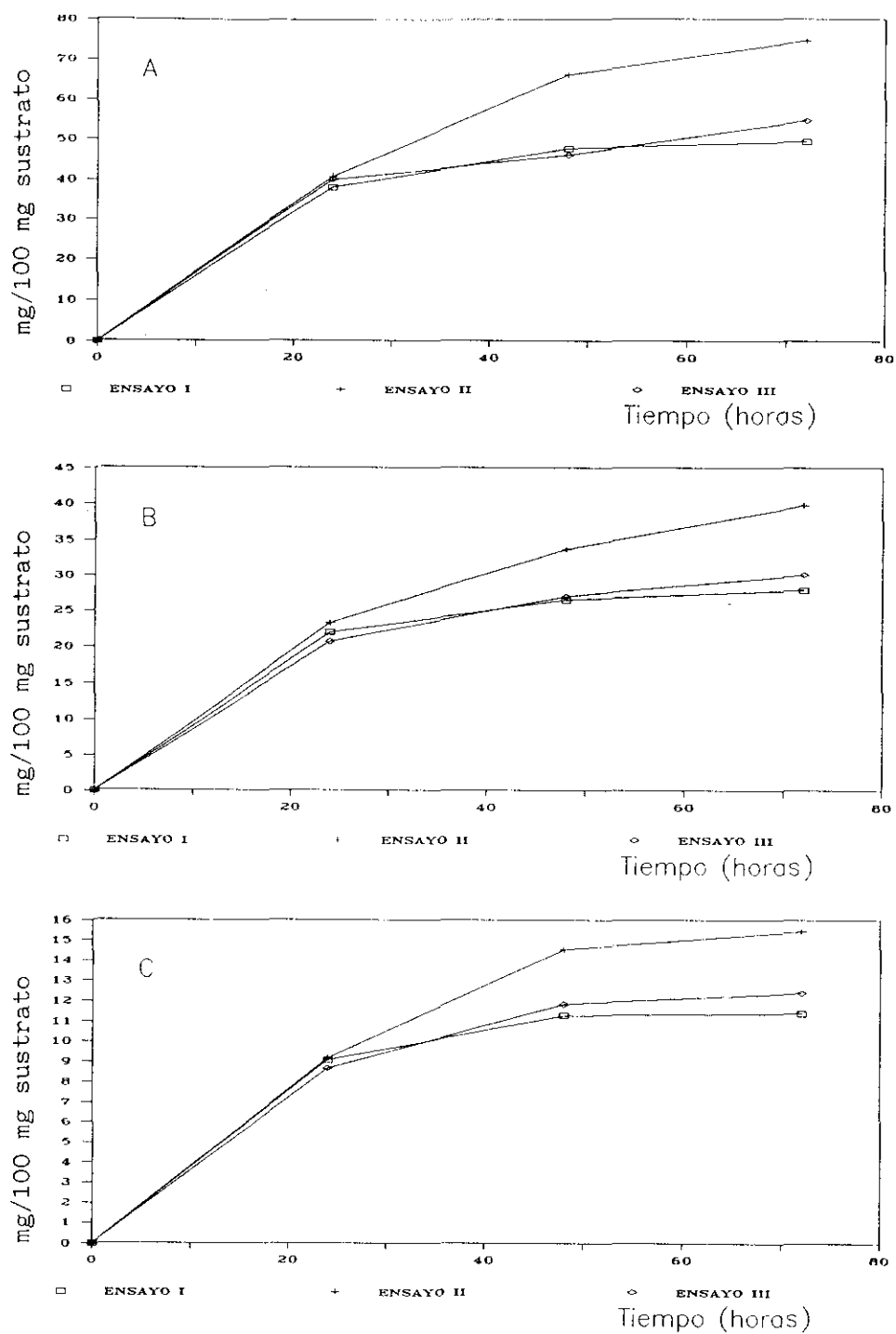


Figura 33. Producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática. Sustratos: (A) Solka Floc HW-200, (B) *O. nervosum* pretratado y (C) *O. nervosum* sin tratar.

- Se observa también que, en general, la diferencia entre el rendimiento global de hidrólisis en el ensayo III ó I no es significativa a pesar de que en el primero de ellos la cantidad de enzima es triple que en el segundo caso.

- Se demuestra con esto que la concentración de enzima utilizada (20UI/g sustrato) no es un factor limitante en la reacción enzimática estudiada y, que es la inhibición por producto final la razón más importante en el desarrollo eficaz de la reacción hidrolítica.

4.1.2.5. Estudios cinéticos de la β -glucosidasa del complejo enzimático.

Los ensayos realizados para la determinación de los parámetros cinéticos de la actividad β -glucosidasa se llevaron a cabo a 50°C y pH 4.8 utilizando como sustratos: celobiosa (sustrato natural) y p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido. El rango de concentraciones empleado fue de 0,5-5 mM y 0,05-0,5 mM respectivamente. Los estudios cinéticos de la actividad β -glucosidasa con ambos sustratos muestran un comportamiento cinético de Michaelis-Menten en ambos casos. En las figuras 34 y 35 se muestran las representaciones de Lineweaver-Burk para cada uno de ellos. Asimismo, se ha estudiado el modelo de inhibición de esta enzima por glucosa, que ha resultado ser de naturaleza competitiva. Esto supone la posibilidad de reducir el efecto inhibitorio aumentando dentro de ciertos límites la concentración de sustrato. Los valores de K_i , utilizando pNPG y celobiosa como sustrato, fueron determinados a partir de las representaciones de Lineaweaver-Burk.

En la tabla XIII se recogen las constantes calculadas experimentalmente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Evans (1985) para el caso de la β -glucosidasa de *Coriolus versicolor*. La baja K_m aparente correspondiente a la β -glucosidasa para el sustrato pNPG ($K_m = 0,095$ mM) frente a la correspondiente para celobiosa ($K_m = 2,62$ mM), indica que la enzima presenta una mayor afinidad por el sustrato β -D-glucósido sintético que por la celobiosa, su sustrato natural, esta preferencia por el aril- β -glucósido ha sido también observada para β -glucosidasas obtenidas a partir de otras especies (Wase y col., 1985).

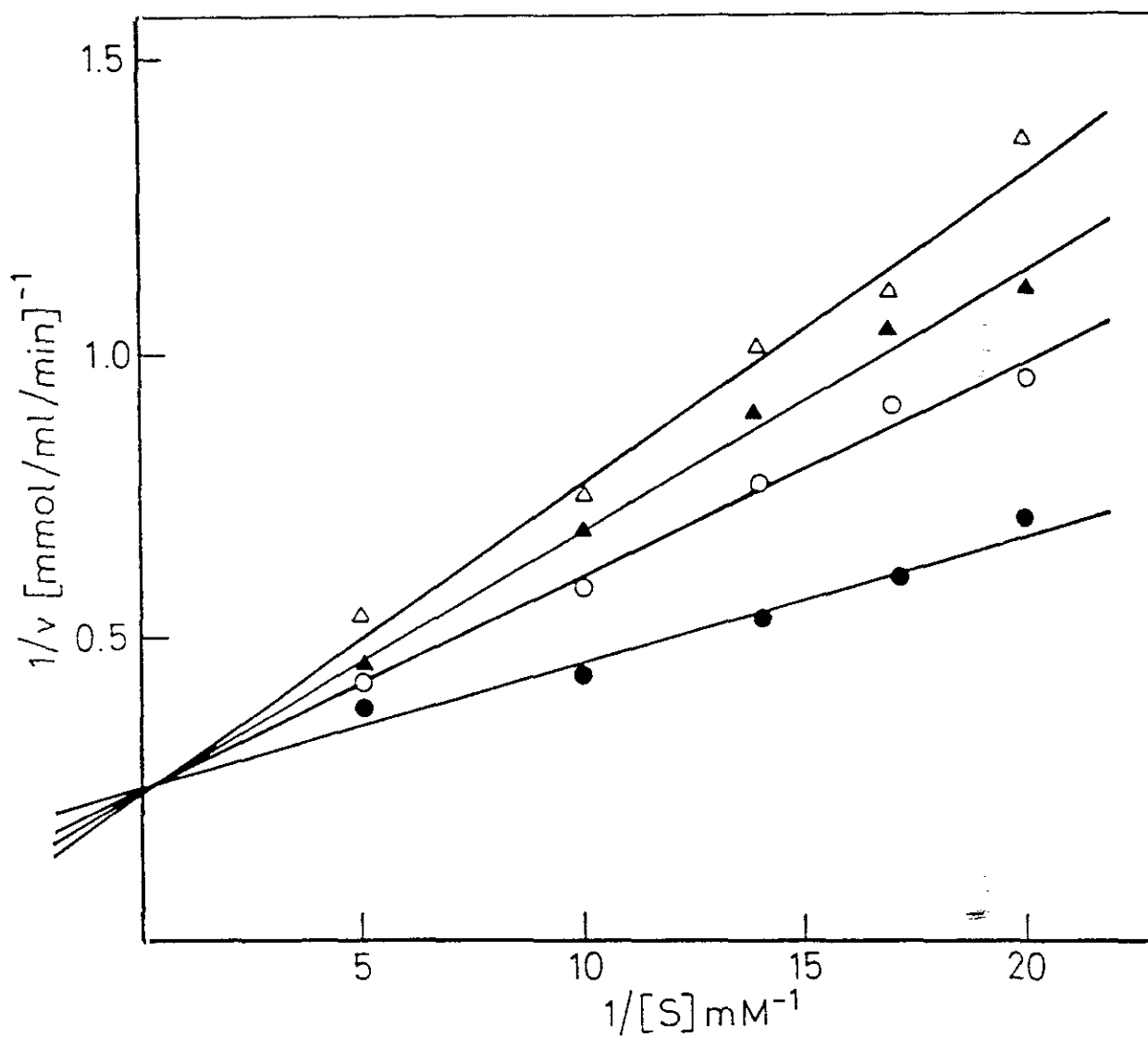


Figura 34. Efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad de la β -glucosidasa utilizando pNPG como sustrato. Representación de Lineweaver-Burk .
 (●) sin glucosa, (○) 0.5 mM, (▲) 0.75 mM y (△) 1 mM.

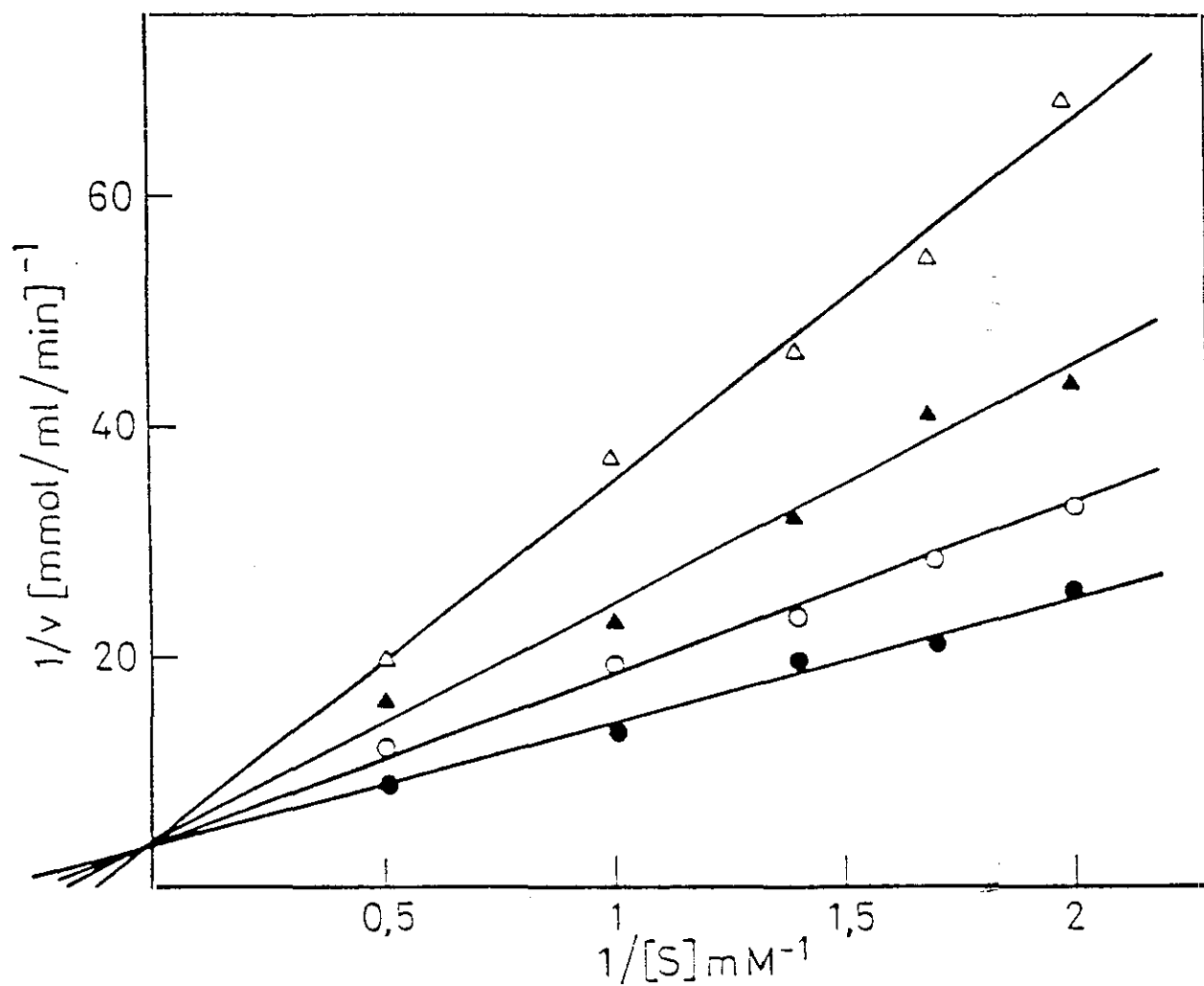


Figura 35. Efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad de la β -glucosidasa utilizando celobiosa como sustrato. Representación de Lineweaver-Burk .
 (\bullet) sin glucosa. (\circ) 1 mM. (\blacktriangle) 2.5 mM y (Δ) 5 mM.

	Celobiosa	p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido
Km (mM)	2,626	0,095
Vmax (nmol/ml/min)	0,247	0,0041
Ki (mM)	2,56	0,8

TABLA XIII: Parámetros cinéticos de la β -Glucosidasa de *T.longibrachiatum* QM9414.

4.2. Pretratamientos de la biomasa de Onopordum nervosum.

Uno de los aspectos fundamentales a tener en cuenta para el diseño y desarrollo de un proceso de hidrólisis enzimática de celulosa es la aplicación de un pretratamiento efectivo, cuya naturaleza dependerá, entre otros factores, del tipo de sustrato elegido. La presencia de lignina y hemicelulosa así como la existencia de zonas cristalinas en las fibras celulósicas hacen imprescindible pretratar por métodos físicos, químicos o biológicos los sustratos celulósicos antes de efectuar su hidrólisis, con objeto de alterar su estructura y facilitar el posterior ataque por las enzimas.

Por este motivo, uno de los principales objetivos en el desarrollo del trabajo recogido en esta memoria ha sido la evaluación de diferentes pretratamientos de la biomasa lignocelulósica de *O. nervosum* con objeto de seleccionar aquellos que ofrecieran mejores resultados desde el punto de vista del aumento del rendimiento de la posterior sacarificación de dicho material.

En general y dada las características químicas y estructurales de los materiales lignocelulósicos, los requisitos que deben cumplir los tratamientos previos a un proceso de hidrólisis enzimática serían:

- reducción de la cristalinidad de la celulosa.
- deslignificación de la biomasa.
- aumento de la densidad de la biomasa.
- bajos costes económicos.
- bajos inputs energéticos.
- posibilidad de aprovechamiento de las fracciones de hemicelulosa y lignina separadas de la celulosa.

En nuestro caso, el efecto de los pretratamientos sobre el material lignocelulósico se ha evaluado a dos niveles diferentes. En primer lugar, sobre la pérdida de material ocurrida como consecuencia del tratamiento y sobre la composición del residuo obtenido. En segundo lugar, se ha estimado la modificación experimentada en la fracción celulósica, por el incremento de su susceptibilidad al ataque enzimático.

La pérdida de material se ha evaluado a partir del porcentaje de dicho material remanente después del tratamiento así como de la composición del residuo en celulosa, lignina y cenizas.

El éxito de un pretratamiento se podría valorar por la cantidad de enzima necesaria para obtener un grado razonable de hidrólisis o comparando el valor de sacarificación obtenido utilizando concentraciones de celulasas relativamente bajas (≤ 1 UIPF/ml) y bajas relaciones enzima-sustrato (≤ 20 UIPF/g sustrato). Este segundo sistema es el que se ha utilizado en nuestro caso dado que estas condiciones proporcionan una medida más sensible del efecto de pequeños cambios en las condiciones del pretratamiento en la digestibilidad enzimática.

El rendimiento de hidrólisis se calculó a partir de los azúcares reductores y glucosa liberados en el medio de reacción y se expresó utilizando dos indicadores diferentes: eficiencia de sacarificación y porcentaje de conversión de celulosa en glucosa.

La eficacia de sacarificación hace referencia a la susceptibilidad de un sustrato, nativo o pretratado, a la hidrólisis por celulasas. Se calculó a partir de la glucosa liberada y la glucosa potencialmente liberable mediante la expresión:

$$ES = Gp/Gr$$

Donde:

Gp es el porcentaje de glucosa liberada después de 48 horas de hidrólisis de un sustrato (basado en el peso seco de este sustrato)

Gr es el rendimiento teórico máximo de glucosa de ese sustrato, calculado por el método analítico de Puls que se recoge en el apartado correspondiente del capítulo de Materiales y Métodos.

El porcentaje de conversión de celulosa hace referencia no sólo a la susceptibilidad de hidrólisis de un material pretratado sino que incluye también el efecto de posibles pérdidas de celulosa durante el pretratamiento. Para el cálculo se utilizó la siguiente expresión:

$$CC = Gp \cdot r / Gi$$

Donde:

Gp es el porcentaje de glucosa liberada después de 48 horas de hidrólisis de un sustrato (basado en el peso seco de ese sustrato).

r es el porcentaje de sustrato inicial (como peso seco) recuperado después del pretratamiento.

Gi es el rendimiento teórico máximo de glucosa en el sustrato nativo, calculado por el método de Puls.

4.2.1. Composición de la materia prima.

Para la realización del análisis de la composición química, la biomasa de *O. nervosum* secada a 60°C fue previamente triturada en un molino con un paso de malla de 2 mm.

Los análisis de la materia prima realizada según los métodos descritos en el apartado 3.3.2. figuran en la tabla XIV. Como queda reflejado en dicha tabla, la biomasa de *O. nervosum* está formada principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, que en su conjunto, constituye alrededor de un 65% del peso seco de su materia y un contenido en cenizas próximo al 10%.

4.2.2. Pretratamientos ensayados.

4.2.2.1. Molienda.

Como pretratamiento previo a cualquier otro, se ha estudiado la influencia del grado de molienda de la lignocelulosa del cardo nativo sobre el incremento de la accesibilidad de las enzimas al sustrato.

Los resultados obtenidos en esta primera etapa indican que el grado de molienda, no afecta en gran medida a la producción de glucosa y azúcares reductores en la hidrólisis enzimática (tabla XV), al menos en el rango de tamaño de partícula estudiado (0,25-2 mm). Por ello, la biomasa de cardo utilizada para el estudio posterior de pretratamientos fue molida y recogida a través de un tamiz de malla de 2 mm.

Comportamiento similar ha sido observado por otros autores. McDonald y col. (1983), estudiaron el efecto del tamaño de partícula en la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática a las 48 horas sobre zuros de maíz, encontrando que ésta es independiente del tamaño de partícula en el rango estudiado (45-300 μm). Rivers y Emert (1988), utilizando sustratos tales como bagazo de caña de azúcar y paja de trigo, no encuentran que el tamaño de partícula sea un factor principal en la hidrólisis enzimática en el rango estudiado (107-947 μm).

COMPONENTE	Vm	Cv
Solubilidad en NaOH 1%	51,46	0,97
Solubilidad en agua fría	17,36	3,29
Solubilidad en agua caliente	21,25	1,96
Extracto alcohol:benceno (1:2)	7,83	2,80
Proteínas	7,80	1,20
Celulosa	29,65	2,29
Azúcares reductores	49,97	2,14
Xilosa	11,84	1,32
Arabinosa	2,36	1,50
Lignina Klason	20,36	2,45
Cenizas	10,42	1,25

TABLA XIV. Composición química de la biomasa del cardo *O. nervosum*. Los valores están expresados en porcentaje respecto a peso de biomasa seca.
Vm=valor medio.
Cv=Coeficiente de variación (%).
nº determinaciones=6

Diámetro (mm)	mg Glucosa/100 mg sustrato Gp		mg Azúcares Reductores/ 100 mg sustrato	
	Vm	Cv	Vm	Cv
0,25	8,66	(2,86)	10,59	(3,52)
0,50	8,55	(2,08)	10,89	(2,99)
0,75	8,69	(3,13)	11,44	(2,95)
1,00	8,48	(1,30)	10,88	(2,73)
2,00	8,59	(2,73)	11,36	(2,87)

TABLA XV. Influencia del grado de molienda en la producción de glucosa y azúcares reductores por hidrólisis enzimática.

4.2.2.2. Pretratamiento alcalino.

4.2.2.2.1. Pretratamiento con hidróxido sódico.

Hasta hace relativamente pocos años, el tratamiento con sosa cáustica era aplicado fundamentalmente para aumentar la digestibilidad de los materiales lignocelulósicos utilizados para alimentación de ganado. Diversos autores han estudiado el efecto del tratamiento con hidróxido sódico sobre la composición químico-bromatológica y la digestibilidad de subproductos agrícolas y agroindustriales, con especial hincapié en las pajas de cereales, y la mayoría de estos estudios coinciden en afirmar que el efecto más importante es el cambio en la proporción relativa de los componentes de la pared celular, reduciéndose, en general, la fibra neutro detergente. Sin embargo dichos efectos dependen del tipo de tratamiento, concentración de álcali, temperatura, tiempo de actuación, lavado posterior (Rexen y col., 1976; González Santillana, 1978). Así, una paja embebida en NaOH al 5,8% durante 48 horas incrementa su digestibilidad "in vitro" desde un 38,7 hasta un 46,3% (Hadjipanayotou, 1984). El tratamiento con NaOH al 1,35% del bagazo de caña de azúcar durante 18 horas a temperatura ambiente produce un aumento de la digestibilidad "in vitro" de la materia orgánica de 197 (g MO/Kg bagazo seco) a 601 (g MO/Kg bagazo seco) (Playne, 1984).

Es bien conocido el efecto de una solución de hidróxido sódico (de aproximadamente 10%) sobre la celulosa nativa: se produce hinchamiento, que se traduce en aumento del área superficial interna, disminución del grado de polimerización, disminución del índice de cristalinidad, separación de los elementos estructurales, lignina y carbohidratos, y formación de una celulosa que difiere considerablemente de la primitiva, la nueva celulosa se hidroliza un 40% más rápidamente que la original (Millet y col., 1954).

Los distintos sustratos responden de forma diferente al tratamiento con NaOH. No existe uniformidad de respuesta para las distintas especies vegetales, si bien, parece que está relacionada con su contenido en lignina. Así, por ejemplo, Feist y col. (1970) observan que la digestibilidad de las maderas blandas, maderas con alto contenido en lignina, aumenta solo ligeramente con el tratamiento con NaOH, mientras que la digestibilidad de algunas maderas duras y otros materiales lignocelulósicos, con bajo contenido en lignina, aumentan significativamente con un tratamiento con NaOH. Aunque el hidróxido sódico tiene un efecto muy marcado sobre maderas duras y paja, tiene, sin embargo, poco efecto en la digestibilidad del algodón, los resultados presentados por Moore y col. (1972) muestran que el porcentaje de azúcares reductores (expresados como glucosa) no varían cuando el algodón sufre un tratamiento alcalino.

En el presente apartado, se ha estudiado el efecto del pretratamiento alcalino con NaOH en el rendimiento de la hidrólisis enzimática del *O. nervosum*. Las variables estudiadas: temperatura, concentración de álcali y tiempo de pretratamiento, fueron elegidas tratando de minimizar los costes asociados a la cantidad de álcali y consumo energético durante el pretratamiento.

Recuperación de material inicial.

Dadas las características químicas del pretratamiento y del sustrato se controlaron las pérdidas de material sufridas en esta etapa, identificándose en las tablas como porcentaje de recuperación de material inicial (r).

En las tablas XVI, XVII, XVIII y XIX se muestran los valores de porcentaje de recuperación de material inicial para las distintas condiciones estudiadas. Como se puede observar, la solubilidad del sustrato en soluciones alcalinas es mayor cuanto mayor es la temperatura de tratamiento y tiempo del mismo. El residuo final obtenido, disminuye notablemente cuando el tratamiento fue efectuado con concentraciones de NaOH del 2%. Es evidente, además, que la solubilización ocurre sobre todo durante los primeros minutos. A 100°C, por ejemplo, y para concentraciones de álcali del 1 y 2 % se producen el 73% y el 85% respectivamente de las pérdidas máximas ocurridas en cada caso durante los 10 primeros minutos. A partir de este momento se produce una pérdida gradual durante los siguientes 30 minutos. Esta rápida solubilización inicial fue característica para todos los rangos de temperatura y concentración de álcali estudiados.

Podemos también señalar, que cuando las condiciones en las que se realizó el pretratamiento fueron suaves, es decir aquellos pretratamientos realizados a temperatura ambiente durante 90 minutos y en ausencia de álcali, se produce una solubilización del 23,25% aumentando ésta al 32,9% cuando la temperatura de pretratamiento se elevó a 150°C.

En las condiciones más severas de pretratamiento (150°C, 2% NaOH y tiempo 90 minutos) se produce hasta el 61,16% de la solubilización del material lignocelulósico.

Comportamiento similar fue observado por McDonald y col. (1983) cuando realizaron el tratamiento con NaOH sobre zuros de maíz. En las condiciones estudiadas por estos autores, rango de concentración de NaOH 0-2%, temperatura (100-150°C) y tiempo de pretratamiento (1-60 min.), se observa también que el grado de solubilización depende de la severidad del pretratamiento siendo los principales factores que influyen: tiempo, concentración de álcali y temperatura. Durante los primeros 10 minutos se produce el 85% de la solubilización. Los mismos autores, obtienen un rango de solubilización de 55-65% con tratamiento con NaOH (1-2%) y temperatura (100-150°C); en ausencia de álcali el rango de solubilización fue de 18-28%.

Recuperación de celulosa y la lignina.

CONDICIONES		% RECUPERACION DE MATERIAL INICIAL (r)* Vm	RENDIMIENTO HIDROLISIS ENZIMATICA			
concentra- ción (%)	tiempo (min)		PRODUCCION GLUCOSA mg/100 mg sustrato Gp Vm Cv	PRODUCCION AZUCARES REDUCTORES mg/100 mg sustrato Vm Cv	CONVERSION DE GLUCOSA CC (%) Vm Cv	g Glucosa/Kg de sustrato nativo
0	90	76,75	9,08 (7,24)	11,92 (1,28)	22,47 (4,65)	69,65
1	30	75,00	7,41 (2,47)	18,22 (4,02)	17,96 (2,47)	55,60
	60	70,00	15,80 (10,5)	20,75 (2,41)	35,73 (10,5)	110,62
	90	71,00	12,79 (3,83)	18,00 (5,73)	29,31 (2,27)	90,77
2	10	80,87	7,84 (10,49)	9,38 (6,11)	20,47 (10,4)	63,37
	30	71,20	13,83 (4,06)	24,06 (6,28)	31,80 (3,60)	98,47
	60	70,50	15,50 (9,01)	22,36 (6,03)	35,29 (9,01)	109,26
	90	65,00	17,64 (6,23)	22,72 (6,62)	37,03 (6,23)	114,66

TABLA XVI. Efecto del pretratamiento alcalino con hidróxido sódico a 25°C sobre: Porcentaje de recuperación del material inicial (expresado en peso seco) (r) y el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = valor medio.

Cv = coeficiente de variación (%)

n = 4

n* = 2

CONDICIONES		% RECUPERACION DE MATERIAL INICIAL (r)*	RENDIMIENTO HIDROLISIS ENZIMATICA			
Concentración	Tiempo (min)		PRODUCCION GLUCOSA mg/100 mg sustrato Gp Vm Cv	PRODUCCION AZUCARES REDUCTORES mg/100 mg sustrato Vm Cv	CONVERSION DE GLUCOSA CC (%) Vm Cv	g Glucosa/Kg de sustrato nativo
0	30	85,00	10,73 (9,97)	13,39 (12,8)	29,47 (9,97)	91,23
	60	84,50	8,95 (3,09)	13,58 (8,74)	24,56 (3,09)	75,61
	90	79,00	12,97 (4,43)	15,97 (5,25)	33,10 (4,43)	102,47
	180	76,50	13,49 (7,51)	16,74 (5,71)	33,34 (7,51)	103,21
	300	66,05	10,59 (8,02)	15,89 (5,07)	22,64 (6,73)	70,15
1	0	71,50	14,66 (8,16)	19,14 (7,77)	33,87 (8,16)	104,85
	10	65,06	24,24 (2,17)	33,96 (2,83)	56,94 (1,62)	157,72
	20	60,00	22,96 (6,50)	34,31 (13,8)	44,50 (6,50)	137,77
	30	63,15	19,55 (1,63)	34,03 (6,35)	39,88 (1,80)	123,47
	60	53,00	28,65 (2,80)	36,78 (5,62)	49,05 (2,80)	151,87
	90	52,50	25,09 (4,53)	35,91 (2,94)	43,33 (3,47)	134,20
2	0	68,50	12,75 (4,91)	17,46 (2,19)	28,20 (4,91)	87,31
	10	64,10	19,84 (4,55)	24,48 (2,55)	41,08 (4,72)	127,17
	30	46,00	25,11 (3,65)	34,94 (4,24)	37,34 (7,28)	115,48
	60	66,00	24,05 (9,75)	25,90 (10,5)	51,28 (9,75)	158,75
	90	57,40	24,12 (7,97)	36,72 (3,68)	44,04 (6,52)	137,50

TABLA XVII. Efecto del pretratamiento alcalino con hidróxido sódico a 100°C sobre: Porcentaje de recuperación del material inicial (expresado como peso seco) después del pretratamiento (r) y el rendimiento de la hidrólisis enzimática. Vm = valor medio. Cv = coeficiente de variación (%). n = 4 *n = 2

CONDICIONES		% RECUPERACION DE MATERIAL INICIAL (r)* Vm	REDIMIENTO HIDROLISIS ENZIMATICA						
Concentra- ción	Tiempo (min)		PRODUCCION GLUCOSA mg/100 mg sustrato Gp		PRODUCCION AZUCARES REDUCTORES mg/100 mg sustrato		CONVERSION DE CELULOSA EN GLUCOSA CC (%)		g Glucosa/Kg sustrato nativo
			Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	
0	90	71,2	12,21 (2,80)		15,18 (1,87)		28,08 (2,80)		86,95
	180	73,25	12,76 (2,09)		16,08 (7,78)		30,18 (2,09)		93,44
	300	70,05	13,59 (1,18)		17,06 (5,76)		30,76 (1,18)		95,23
1	2	67,00	20,82 (9,06)		34,98 (1,92)		45,06 (9,06)		139,49
	5	63,96	19,59 (5,03)		35,62 (4,21)		40,47 (4,98)		125,31
	10	62,43	19,70 (4,25)		32,56 (4,21)		39,69 (2,45)		122,97
	30	45,15	21,96 (2,17)		29,53 (2,87)		32,02 (1,19)		99,16
	60	44,90	18,33 (1,71)		29,83 (1,39)		26,58 (1,71)		82,29
	90	44,70	12,87 (5,29)		20,34 (2,35)		18,58 (5,25)		57,52
2	10	55,65	21,81 (2,76)		30,71 (2,00)		39,18 (1,37)		121,35
	30	41,01	15,45 (1,02)		21,75 (2,30)		20,47 (1,08)		63,36
	60	40,90	23,22 (5,74)		33,13 (1,34)		30,68 (5,74)		94,99
	90	40,90	23,30 (5,13)		33,09 (1,18)		30,77 (5,13)		95,28

TABLA XVIII. Efecto del pretratamiento alcalino con hidróxido sódico a 120 °C sobre: Porcentaje de recuperación del material inicial (expresado en peso seco) (r) y el rendimiento de la hidrólisis enzimática.
Vm = valor medio. Cv = coeficiente de variación (%). *n = 2 n = 4.

CONDICIONES		% RECUPERACION DE MATERIAL INICIAL (r)* Vm	RENDIMIENTO HIDROLISIS ENZIMATICA						
Concentra- ción	Tiempo (min)		PRODUCCION GLUCOSA mg/100 mg sustrato Gp Vm Cv		PRODUCCION AZUCARES REDUCTORES mg/100 mg sustrato Vm Cv		CONVERSION DE GLUCOSA CC (%) Vm Cv		g Glucosa/Kg de sustrato nativo
0	90	67,10	19,56	(1,41)	27,86	(1,19)	42,40	(1,41)	
	180	62,50	19,06	(5,21)	24,79	(4,48)	38,47	(5,21)	119,10
	300	58,00	22,53	(5,59)	32,79	(1,97)	42,05	(6,20)	130,66
1	2	56,00	23,49	(2,79)	38,56	(4,55)	42,48	(2,79)	131,52
	5	63,45	23,49	(2,80)	32,44	(8,16)	48,13	(5,46)	149,02
	10	55,39	26,40	(4,25)	39,45	(4,47)	50,60	(1,93)	156,77
	30	47,40	8,04	(1,53)	11,21	(4,02)	12,40	(1,15)	38,10
	60	47,60	2,90	(14,9)	8,95	(5,27)	4,45	(14,9)	13,78
	90	48,55	3,21	(4,41)	7,99	(8,89)	5,03	(3,95)	15,59
2	10	51,81	24,38	(4,81)	31,55	(4,13)	40,76	(3,08)	126,29
	30	38,90	1,32	(6,74)	4,62	(7,24)	1,66	(9,67)	5,13
	60	39,10	1,18	(8,55)	4,12	(5,98)	1,49	(8,55)	4,62
	90	38,84	1,38	(10,9)	4,47	(5,98)	1,73	(9,95)	5,37

TABLA XIX Efecto del pretratamiento alcalino con hidróxido sódico a 150°C sobre: Porcentaje de recuperación del material inicial (expresado en peso seco) (r) y el rendimiento de la hidrólisis enzimática. . . .
Vm = valor medio. Cv = coeficiente de variación. (%). *n = 2 n = 4.

Para este pretratamiento se realizó un rastreo previo de diferentes condiciones de temperatura, concentración y tiempo. De los 56 tipos de ensayos realizados, que se recogen en las tablas XVI, XVII, XVIII y XIX, se seleccionaron 27 para la realización del estudio más detallado del patrón de solubilización durante el pretratamiento. En la tabla XX se recogen los valores de composición (glucosa, azúcares reductores y lignina) expresados en porcentaje con respecto a materia seca para cada uno de los residuos obtenidos después de los tratamientos alcalinos seleccionados. En la tabla XXI se muestran los porcentajes de recuperación de los diferentes componentes analizados sobre el residuo, así como los rendimientos de hidrólisis enzimática evaluados como eficacia de sacarificación (%). El análisis de la varianza según diseño factorial $3 \times 2 \times 3$ se muestra en el anexo III.

Este tipo de pretratamiento solubiliza fundamentalmente lignina y hemicelulosa (estimada a partir de la disminución de los azúcares reductores). La solubilización de lignina llega en las condiciones más drásticas al 61,58%.

La solubilización fundamentalmente de hemicelulosa y lignina por la acción del hidróxido sódico ha sido observada por numerosos autores. Probablemente, ello es debido a la ruptura de las uniones éster entre la lignina y xilano (Rivers y Emert, 1988; Gharpuray y col., 1983).

Con respecto a la recuperación de glucosa, ésta disminuye significativamente al aumentar la temperatura y concentración de álcali, siendo esta disminución bastante rápida sobre todo en los primeros 30 minutos, y no encontrándose diferencias significativas a partir de los 30 minutos (entre los 30 min. y 90 min.). El análisis de la varianza, según diseño factorial $3 \times 2 \times 3$, indica que la interacción temperatura-concentración de NaOH y temperatura-tiempo de pretratamiento resultan muy significativas ($p \leq 0,001$) y la interacción concentración de álcali-tiempo de pretratamiento resulta significativa ($p \leq 0,01$).

En las condiciones más severas (150°C, 2% NaOH y 90 min.) se recupera solamente el 49,07% de la glucosa en el residuo.

Por otra parte, la fracción de lignina es la más solubilizada por efecto del tratamiento, aunque como hemos comentado, en condiciones extremas se puede llegar a solubilizar cerca del 50% de la celulosa. Aunque la deslignificación aumenta con la severidad del pretratamiento, no se observan diferencias significativas en la recuperación de lignina cuando la temperatura utilizada en la realización del pretratamiento se eleva por encima de 120 °C, además, la deslignificación mayoritaria se produce durante los primeros 10 minutos del pretratamiento, no produciéndose una disminución significativa a partir de los 30 min. (entre 30 y 90 minutos). La deslignificación a 100°C es más lenta. Podemos observar que el efecto único de la temperatura no produce deslignificación, ésta sólo se produce cuando el efecto temperatura se combina con el efecto de adición de álcali, tal como se puede observar a partir de los valores obtenidos para cada una de las condiciones de temperatura estudiadas cuando no se añadió álcali.

CONDICIONES			% RECUPERACION DEL MATERIAL INICIAL (r)*		GLUCOSA (%)		AZUCARES REDUCTORES (%)		LIGNINA (%)	
Temp. (°C)	Conc. (%)	tiempo (min.)	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
25	0	90	76,75	(2,63)	33,19	(2,01)	48,53	(3,21)	20,70	(6,46)
	1	30	7,00		37,69	(1,01)	54,64	(3,19)	15,89	(5,73)
	1	90	71,00	(1,63)	32,66	(5,02)	50,35	(4,31)	19,48	(6,60)
	2	90	65,00		29,49	(7,96)	41,39	(5,15)	19,89	(7,97)
100	0	300	66,25	(1,31)	29,94	(1,64)	45,92	(5,32)	20,85	(6,04)
	1	10	65,06	(0,99)	42,41	(3,85)	49,15	(4,53)	18,33	(7,59)
	1	30	63,15	(0,27)	31,68	(3,88)	46,21	(4,41)	22,08	(6,21)
	1	90	53,50	(1,08)	37,57	(0,88)	50,95	(3,51)	21,49	(5,34)
	2	10	64,10	(0,18)	41,60	(2,31)	59,86	(1,20)	16,09	(4,41)
	2	30	46,00	(3,77)	43,98	(0,84)	61,31	(0,88)	20,44	(7,27)
	2	90	57,00	(14,1)	32,43	(10,9)	45,40	(5,88)	18,94	(7,96)
120	0	300	70,05		32,83	(0,85)	4,81	(4,96)	21,59	(4,44)
	1	5	63,96	(0,07)	38,52	(2,90)	39,57	(7,12)	21,68	(4,43)
	1	10	62,43	(2,90)	34,51	(7,33)	46,69	(3,92)	18,39	(10,3)
	1	30	45,15	(1,66)	37,86	(4,30)	43,87	(3,83)	20,00	(8,10)
	1	90	44,70	(0,52)	43,19	(2,05)	61,38	(3,24)	21,68	(4,45)
	2	10	55,65	(1,62)	39,67	(6,26)	53,53	(4,39)	20,27	(1,82)
	2	30	41,01	(0,31)	46,74	(3,32)	63,31	(0,75)	21,90	(4,52)
	2	90	40,90		41,26	(2,57)	54,95	(2,23)	17,30	(2,00)
150	0	300	58,00	(9,95)	32,86	(6,02)	39,65	(7,29)	28,25	(2,84)
	1	5	63,45	(4,64)	45,86	(5,21)	56,30	(2,36)	23,18	(3,99)
	1	10	59,39	(2,70)	33,80	(2,51)	44,86	(1,13)	19,85	(4,12)
	1	30	47,40	(2,19)	41,84	(4,41)	53,21	(0,55)	21,25	(3,79)
	1	90	48,56	(1,53)	42,27	(3,87)	53,20	(2,21)	21,53	(1,39)
	2	10	51,81	(1,83)	34,98	(7,54)	51,72	(7,52)	21,14	(3,59)
	2	30	38,90	(4,75)	36,51	(6,20)	56,93	(2,92)	17,14	(3,46)
	2	90	38,85	(4,03)	39,15	(3,72)	43,35	(6,53)	1,90	(5,80)

TABLA XX. Porcentaje de recuperación del material inicial (expresado como peso seco) después del pretratamiento (r) y composición de los residuos sólidos para las distintas condiciones de pretratamiento alcalino con hidróxido sódico ensayadas. Vm = valor medio. Cv = coeficiente de variación. (%). n = 4 n* = 2.

CONDICIONES			RECUPERACION GLUCOSA (%)		RECUPERACION A. REDUCTORES (%)		RECUPERACION LIGNINA (%)		ES (%)	
Temp. (°C)	Conc. (%)	tiempo (min.)	Vm	Cv	vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
25	0	90	82,24	(1,26)	71,90	(3,91)	98,88	(4,44)	27,33	(5,49)
	1	30	91,29	(1,01)	79,11	(3,19)	74,23	(5,73)	19,67	(2,43)
	1	90	75,54	(3,61)	68,98	(2,69)	86,10	(5,60)	38,80	(1,12)
	2	90	61,90	(7,96)	51,94	(5,15)	80,53	(7,97)	59,89	(2,02)
100	0	300	64,05	(0,83)	58,69	(4,02)	86,03	(5,20)	35,34	(6,62)
	1	10	89,09	(2,88)	61,70	(3,58)	74,24	(6,80)	57,20	(2,73)
	1	30	64,63	(4,14)	56,33	(4,69)	86,86	(6,42)	61,76	(3,07)
	1	90	64,91	(1,04)	52,94	(4,59)	71,4	(6,29)	66,77	(4,14)
	2	10	86,13	(2,48)	74,07	(1,28)	64,24	(4,42)	47,67	(2,42)
	2	30	65,36	(4,60)	54,43	(2,89)	58,48	(4,57)	57,07	(2,89)
	2	90	59,01	(3,38)	49,66	(8,87)	66,72	(7,62)	74,57	(3,36)
120	0	300	74,28	(0,85)	64,65	(4,96)	94,21	(4,44)	46,41	(1,69)
	1	5	79,58	(2,85)	48,86	(7,07)	86,37	(4,36)	50,85	(3,88)
	1	10	69,48	(4,54)	56,22	(1,02)	71,46	(9,65)	57,19	(4,36)
	1	30	55,18	(2,69)	38,25	(5,41)	56,25	(7,94)	58,06	(3,67)
	1	90	62,37	(2,36)	52,97	(3,75)	60,36	(4,14)	29,80	(5,54)
	2	10	71,26	(4,64)	57,56	(5,65)	70,29	(3,10)	55,06	(3,80)
	2	30	61,92	(3,63)	50,12	(1,6)	55,96	(4,55)	33,08	(3,42)
	2	90	54,51	(2,57)	43,39	(2,21)	44,09	(7,00)	56,43	(3,29)
150	0	300	60,81	(6,67)	44,16	(4,15)	103,9	(10,1)	68,59	(3,39)
	1	5	93,83	(2,09)	68,93	(3,41)	91,49	(1,27)	51,30	(5,59)
	1	10	64,01	(1,43)	51,42	(1,57)	73,41	(2,92)	78,08	(2,35)
	1	30	64,02	(2,28)	48,69	(2,74)	62,75	(4,20)	19,23	(3,31)
	1	90	66,27	(2,53)	49,85	(1,07)	65,12	(2,18)	7,597	(4,21)
	2	10	58,48	(5,72)	51,67	(5,71)	68,20	(2,39)	69,79	(3,11)
	2	30	45,77	(1,54)	42,80	(7,65)	41,48	(1,61)	3,62	(10,79)
	2	90	49,07	(2,43)	32,51	(7,67)	38,42	(2,45)	3,53	(10,04)

Tabla XXI. Efecto del pretratamiento alcalino con hidróxido sódico en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina. Efecto en el rendimiento de la hidrólisis enzimática expresado como porcentaje de eficiencia de sacarificación.
Vm = valor medio. Cv = coeficiente de variación. (%) n = 4

Cuando comparamos los distintos pretratamientos llevados a cabo a altas temperaturas (100°, 120° y 150°C) se observa que la interacción de los efectos combinados temperatura-concentración de álcali influyen de forma significativa ($p \leq 0,05$) mientras que las interacciones temperatura-tiempo de pretratamiento y concentración de álcali-tiempo de pretratamiento resultan muy significativas ($p \leq 0,001$).

El comportamiento con respecto a la recuperación en azúcares reductores es similar a aquél que se produce en la recuperación de la glucosa.

En condiciones relativamente suaves, por ejemplo, a 100°C, 10 min. y 1% NaOH, la recuperación de sólidos fue del orden del 65 %, la eliminación de lignina fue del orden del 25,76% y la pérdida de celulosa del 10,91%.

Cuando se compararon nuestros datos con aquéllos obtenidos por otros autores para materiales lignocelulósicos de composición similar al *O. nervosum* observamos ligeras diferencias. Así, por ejemplo, para el tratamiento con NaOH al 1% a 120°C durante 90 minutos en el caso de la paja de trigo, Gharpuray y col. (1983) obtienen un 50% de solubilización por efecto del tratamiento, y pérdidas de celulosa, hemicelulosa y lignina del 40%, 60% y 85% respectivamente. En estas mismas condiciones, con *O. nervosum* encontramos que se solubiliza el 55,3%, siendo las pérdidas de celulosa y lignina del 37,6% y 39,64% respectivamente.

Pérdidas menores de celulosa fueron obtenidas con pretratamiento alcalino de zuros de maíz (McDonald y col., 1983). En el tratamiento alcalino con NaOH al 1%, a 150°C durante 15 minutos, se pierde el 15% de la celulosa, mientras que en el caso del *O. nervosum* en las mismas condiciones de temperatura y concentración de NaOH, pero con un tiempo de pretratamiento de 10 min., las pérdidas de celulosa encontradas por nosotros fueron del 36%.

Rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Como se ha dicho anteriormente la eficacia de un pretratamiento viene dada por el incremento en la hidrólisis enzimática que experimenta un determinado sustrato celulósico. Para su determinación se evaluó la glucosa producida, a partir de la cual se calcularon las eficiencias de sacarificación y eficacia de conversión de celulosa en glucosa de acuerdo con las definiciones antes señaladas.

Producción de glucosa.

Los resultados correspondientes a la producción de glucosa y azúcares reductores (expresados como mg/100 mg sustrato) después de una hidrólisis enzimática durante 48 horas aparecen en las tablas XVI, XVII, XVIII y XIX. En el anexo III se muestra el análisis de varianza de los datos correspondientes al rendimiento de la hidrólisis enzimática.

En general, para todas las condiciones de pretratamiento realizadas se produce un aumento en la producción de glucosa por hidrólisis enzimática. El estudio estadístico indica, que los valores máximos de dicha producción se encuentran a temperaturas de 100°C produciéndose por encima de ésta una disminución significativa ($p \leq 0,001$) en la producción de glucosa. Las diferentes concentraciones estudiadas no dan lugar a resultados significativamente diferentes, aunque la interacción de los efectos temperatura-concentración de álcali resulta muy significativa ($p \leq 0,001$). También resultan muy significativas ($p \leq 0,001$) las interacciones concentración de álcali-tiempo y temperatura-tiempo. El tiempo de pretratamiento tiene también un efecto significativo, los valores más altos se obtienen cuando éste fue menor, no encontrándose, sin embargo, disminución significativa para tiempos largos (30-90 minutos).

McDonald y col. (1983), estudiaron el efecto del pretratamiento alcalino en la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática de zuros de maíz, encontrando que ésta disminuye con el tiempo de pretratamiento, aumentando ligeramente al aumentar la concentración de NaOH (0-2%) a tiempos cortos, ello es debido probablemente a la solubilización de la hemicelulosa y celulosa con lo que se produce una disminución en los azúcares potenciales del residuo.

Eficacia de sacarificación y conversiones de celulosa en glucosa.

Con respecto al rendimiento en la hidrólisis enzimática, se observa que cuando el pretratamiento se realizó a temperatura ambiente (25°C) durante 90 min., aquél aumentó al aumentar la concentración de álcali. Así, cuando la concentración de álcali utilizada fue del 2%, la eficacia de sacarificación (ES%) y la conversión de celulosa (CC%) se multiplicaron por un factor de 2,72 y 1,68 respectivamente con respecto a los valores correspondientes al sustrato no tratado.

La conversión de celulosa en glucosa (%) a temperaturas elevadas (100,120° y 150°C) en general disminuye al aumentar la concentración de álcali del 1 al 2 %. Cuando se estudia la variable tiempo, se observa que su efecto tanto sobre la conversión de celulosa como sobre la eficiencia de sacarificación, va a depender de la temperatura del proceso. A 100°C, las conversiones, en líneas generales, aumentan hasta los 60 min., transcurridos los cuales comienzan a disminuir. Sin embargo, para temperaturas más elevadas (120 y 150°C), es a partir de los primeros 10 min. cuando la conversión de celulosa comienza a disminuir, concretamente a 150°C y tiempos superiores a 10 min. se produce una disminución considerable de ésta así como de la eficacia de sacarificación, llegando incluso a obtenerse valores muy por debajo de los obtenidos para el material sin tratar (150°C, 30-90 min.).

Los valores más altos de hidrólisis a 48 horas fueron encontrados cuando el pretratamiento se realizó en condiciones suaves (100°,120°, 150°C durante 10 min. y concentración de álcali del 1%). En estas condiciones y a 150°C, los valores de eficiencia de sacarificación y conversión de celulosa alcanzaron el 78,08% y el 50,60% respectivamente.

De los resultados expuestos, se puede asegurar que con el pretratamiento alcalino, se aumenta significativamente la digestibilidad enzimática, pero desgraciadamente a costa de importantes pérdidas de materia seca y por tanto, de azúcares potenciales durante el pretratamiento.

En la tabla XXII se comparan los rendimientos de hidrólisis enzimática de la biomasa de *O. nervosum* obtenidos con los pretratamientos óptimos en este trabajo con los citados por otros autores para diferentes sustratos lignocelulósicos.

Debido a las diferentes condiciones de trabajo mostradas en dicha tabla es difícil establecer, con los datos que se ofrecen en ella, comparaciones sobre la facilidad de hidrólisis enzimática de la celulosa de los distintos materiales citados. Sí se puede constatar, sin embargo, la eficacia del pretratamiento, cuando se seleccionan adecuadamente las condiciones de operación, para conseguir altos rendimientos de degradación de la fracción de celulosa en una gran variedad de sustratos lignocelulósicos.

SUSTRATO	S/L (%)	Concen- tración NaOH (%)	Tempera- tura (°C)	Tiempo	ES (%)	CC (%)	Nativo	Referencia
zuro de maíz	6	2	150	15 min	94	79	57	MCdonald, 1983
paja de trigo	13	1	129	1,5 h	88	53	14,1	Gharpuray y col., 1983
bagazo caña azúcar	12	4	85	60 min	70	37	17	Rao y col., 1983
bagazo caña azúcar	-	2	60	24 h	-	67,1	6,1	Rivers y Emert, 1988
paja de trigo	-	2	60	24 h	-	78	21	Rivers y Emert, 1988
hoja de batata	-	2	25	24 h	-	28	10	Bhattacharya y col., 1987
tallo de batata	-	2	25	24 h	-	26	55	Bhattacharya y col, 1987
paja de trigo	-	1	25	1 h	51	44	11	Detroy y col, 1981
paja de trigo	30	1	90	1 h	75	68	11	Detroy y col., 1981
cardo	5	1	150	10 min	78	39	25	Este trabajo
cardo	5	1	100	10 min	57	57	25	Este trabajo

TABLA XXII. Rendimiento de diversos pretratamientos alcalinos con hidróxido sódico de diferentes sustratos lignocelulósicos.

4.2.2.2.2. Pretratamiento con hidróxido cálcico.

Aunque los datos publicados sobre la utilización de hidróxido cálcico para mejorar la digestibilidad de residuos agrícolas, en general, parecen indicar que este de tipo agente químico no es tan efectivo como la utilización del hidróxido sódico, se han obtenido algunos resultados, como los publicados por Winughogo y col. (1984) sobre paja de arroz, que indican que el tratamiento con este tipo de reactivo puede ser incluso más efectivo que el tratamiento con hidróxido sódico, realizado en condiciones similares. Estos autores recomiendan la utilización de una concentración 1,8 veces superior a la utilizada de hidróxido sódico siendo suficiente la impregnación del material durante 24 horas. En estas condiciones y utilizando 20 g Ca(OH)_2 /100 g de paja de arroz, la digestibilidad "in vitro" aumentó desde el 40% para el sustrato sin tratar, hasta el 59% en el caso del sustrato tratado. Resultados similares se obtuvieron cuando se valoró la digestibilidad en rumiantes (Ibrahim y Pearce, 1984). Del mismo modo, el tratamiento con altas concentraciones de Ca(OH)_2 (300g/Kg sustrato) del bagazo de caña de azúcar supone un incremento de la digestibilidad de 197 a 724 (g MO digerida/ Kg materia seca) (Playne, 1984).

La utilización de Ca(OH)_2 podría ser interesante para aumentar la digestibilidad de sustratos lignocelulósicos, debido a su bajo coste. Datos recogidos en la bibliografía muestran que el hidróxido cálcico supone, dependiendo del país, solamente del 7 al 20% del precio del hidróxido sódico por tonelada (Playne, 1984). Otras ventajas adicionales de la utilización de hidróxido cálcico con respecto a la sosa cáustica es su menor efecto corrosivo, facilidad de manejo y la posibilidad de la recuperación de este tipo de reactivo una vez efectuado el pretratamiento, aprovechando la baja solubilidad de este compuesto en agua.

El pretratamiento alcalino con hidróxido cálcico sobre la biomasa del cardo *O. nevosum* se estudió utilizando 2 concentraciones de álcali 0,2 y 1,8%; tres temperaturas diferentes 4, 25 y 100°C y tiempos de pretratamiento de 24 y 48 horas para los realizados a 4 y 25°C y 10 y 30 minutos para el efectuado a 100°C. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XXIII.

Aunque la solubilización y la pérdida de celulosa fueron menores para este pretratamiento que para el realizado con hidróxido sódico, la eficacia de la hidrólisis enzimática fue no solo menor que para el sustrato pretratado con sosa cáustica, sino que incluso, los valores de hidrólisis enzimática obtenidos fueron en todos los casos significativamente inferiores a los del material no tratado indicando la ineficacia de este tratamiento sobre la biomasa del *O. nervosum* en las condiciones estudiadas.

CONCENTRACION (%)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	% RECUPERACIÓN MATERIAL INICIAL (r)	% RECUPERACION GLUCOSA		% RECUPERACION AZUCARES REDUCTORES		% RECUPERACION LIGNINA		ES (%)		CC (%)	
				Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
0.2	4	24 h	79,44	88,94	(3,12)	86,62	(5,21)	81,36	(1,24)	11,31	(1,06)	10,08	(1,06)
	4	48 h	83,81	101,4	(3,33)	96,07	(6,71)	74,54	(4,24)	6,64	(1,19)	6,78	(1,19)
	25	24 h	82,91	89,57	(1,09)	85,74	(5,91)	83,44	(5,27)	9,52	(2,28)	8,52	(2,28)
	25	48 h	84,11	100,2	(1,10)	94,96	(6,74)	95,74	(1,11)	6,79	(2,22)	6,80	(2,22)
	100	10 min	83,06	92,98	(2,21)	94,40	(4,75)	102,37	(2,86)	6,17	(3,92)	5,70	(3,92)
	100	30 min	80,57	89,59	(3,09)	85,67	(2,36)	102,64	(1,37)	11,62	(1,32)	10,33	(1,32)
1.8	4	24 h	85,91	80,61	(1,38)	72,00	(5,47)	71,06	(2,50)	2,10	(8,82)	1,70	(8,82)
	4	48 h	87,71	102,49	(2,96)	79,30	(4,41)	78,12	(1,10)	1,39	(3,56)	1,43	(3,56)
	25	24 h	73,86	69,45	(2,80)	71,13	(5,24)	59,78	(4,68)	1,19	(3,27)	0,82	(3,27)
	25	48 h	76,11	90,58	(0,42)	80,20	(2,55)	77,57	(4,92)	0,91	(7,95)	0,83	(7,95)
	100	10 min	74,75	82,00	(0,64)	68,74	(6,86)	84,54	(7,15)	1,93	(2,65)	1,58	(2,65)
	100	30 min	71,16	86,70	(3,84)	65,21	(2,08)	88,33	(8,01)	1,11	(5,67)	0,95	(5,67)

TABLA XXIII. Efecto del pretratamiento alcalino con hidróxido cálcico en el porcentaje de recuperación de: material inicial (expresado como peso seco), glucosa, azúcares reductores y lignina. Efecto del pretratamiento sobre la hidrólisis enzimática.

Vm = valor medio

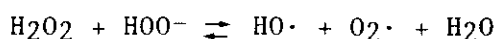
Cv = coeficiente de variación

n = 4

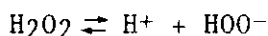
4.2.2.3. Pretratamiento oxidante.

4.2.2.3.1. Pretratamiento con peróxido de hidrógeno.

En la Naturaleza, la lignina es degradada por distintos microorganismos. Aunque el mecanismo de la degradación natural de la lignina es desconocido, se sabe, sin embargo, que el peróxido de hidrógeno juega un papel importante. Es bien conocido que el H_2O_2 es capaz de reaccionar con la lignina, y de hecho esta propiedad se ha aplicado para el blanqueo de pulpa de madera con alto contenido en lignina. Parece ser, que la especie capaz de oxidar la lignina no es el H_2O_2 , sino que se debe al radical hidroxilo ($HO\cdot$) que se forma durante la degradación del H_2O_2 con el anión peróxido:



Esta reacción es fuertemente dependiente del pH, con un intervalo óptimo entre 11,5 y 11,6, que corresponde al pKa de la reacción de disociación del H_2O_2 :



La utilización de H_2O_2 en medio alcalino ha sido aplicado como pretratamiento de biomasa procedente de residuos agrícolas. Así, Gould y Freer (1984) tratando paja de trigo y zuros de maíz con H_2O_2 al 1%, pH 11,5 y temperatura ambiente durante 18-24 horas, se produce aproximadamente el 50% de deslignificación, eliminándose prácticamente toda la hemicelulosa y recuperándose en el residuo toda la celulosa. El residuo obtenido después del pretratamiento puede hidrolizarse enzimáticamente con una eficacia del 90% (basado en el contenido de celulosa del material de partida).

En este trabajo, se ha pretratado la biomasa de *O.nervosum* utilizando las condiciones óptimas descritas por Gould para paja de trigo (H_2O_2 al 1%, pH 11,5; 25°C. 24 horas). Los resultados obtenidos en este caso fueron los siguientes:

Recuperación de material inicial: $44,50 \pm 1,27$

Composición (%): Glucosa: $39,95 \pm 0,39$
Azúcares Reductores: $66,00 \pm 2,04$
Lignina: $15,05 \pm 0,38$
Cenizas: 3,1

Cenizas: 3,1
 Recuperación (%):Glucosa: 57,40
 Azúcares Reductores: 56,69
 Lignina: 41,72
 Rendimiento de hidrólisis enzimática:
 mg Glucosa/100 mg sustrato: 21,94±0,76
 mg Azúcares reductores/100 mg sustrato: 34,07±0,67
 Eficacia de sacarificación (%): 54,91
 Conversión de celulosa en glucosa (%): 31,17

Como se puede observar, la eficacia de sacarificación se multiplica por un factor de 2,4 respecto al sustrato nativo y, se produce además una elevada deslignificación (58,3%). Sin embargo, y como consecuencia de las elevadas pérdidas de celulosa (42,6%), la eficacia global del proceso disminuye considerablemente, expresada como porcentaje de conversión de celulosa en glucosa.

En la tabla XXIV y con objeto de establecer una comparación con los resultados obtenidos por otros autores para diferentes sustratos lignocelulósicos pretratados con H₂O₂ se recogen los valores de eficiencia de sacarificación obtenidos para dichos sustratos así como el correspondiente a *O.nervosum*. En ella, se puede observar la fuerte dependencia del tipo de sustato lignocelulósico para unas condiciones similares de pretratamiento. La eficacia de sacarificación obtenida sobre *O. nervosum* es comparable a la obtenida por Gould (1984) sobre kenaf y sobre roble.

SUSTRATO LIGNOCELULOSICO	% Eficacia de sacarificación	
	-H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
Paja de trigo*	27,2	93,0
Tallo de maíz*	49,8	90,1
Zuro de maíz*	32,1	100
Bagazo de maíz*	62,3	99,0
Alfalfa*	40,9	93,6
Kenaf*	25,7	58,4
Paja de soja*	46,2	74,7
Roble*	21,8	52,5
Cardo	23,0	54,2

TABLA XXIV. Efecto del pretratamiento oxidante en medio alcalino en la eficacia de sacarificación de distintos materiales lignocelulósicos. (*Fuente Gould, 1984)

4.2.2.3.2. Pretratamiento con hipoclorito sódico.

El tratamiento con hipoclorito sódico está descrito en la bibliografía como muy efectivo para producir deslignificación en materiales lignocelulósicos tales como bagazo de caña de azúcar y tallo de algodón (Naim y col., 1986). Este tratamiento se llevó a cabo sobre *O. nervosum* empleando una solución de hipoclorito sódico de tal forma que la relación gramos de cloro por gramo de sustrato a pretratar fuera de 0,7 ó 0,9.

En la tabla XXV, se recogen los resultados obtenidos de porcentaje de recuperación del material inicial (r) de los residuos sometidos a las dos condiciones estudiadas de pretratamiento alcalino con hipoclorito sódico. En la misma tabla se recogen además, las composiciones de los residuos obtenidos después del pretratamiento. La pérdida de material es en ambos casos de un 30%, valor comparable a los obtenidos en bagazo de caña de azúcar y tallo de algodón (alrededor del 26% en ambos casos) por Naim y col. (1986) en condiciones similares de tratamiento.

En la tabla XXVI, se recogen los datos de recuperación de los componentes mayoritarios de la biomasa expresados como recuperación referidos a material inicial. Los resultados muestran un alto porcentaje de deslignificación (31% cuando se utilizó 0,7 g Cl₂/ g sustrato y 40% cuando se utilizó 0,9 g Cl₂/ g sustrato), sin embargo, no se consigue el efecto de deslignificación total obtenido en estas mismas condiciones para los sustratos lignocelulósicos anteriormente mencionados.

Los valores de producción de glucosa y azúcares reductores, expresados como mg/100 mg sustrato después de 48 horas de hidrólisis, así como los valores de eficiencia de sacarificación y conversión de celulosa se recogen en la tabla XXVII. Como se puede observar el rendimiento de hidrólisis (expresado como producción de glucosa en el medio de reacción después de 48 horas) experimenta con este tipo de pretratamiento un incremento de 1,98 y 2,44 veces respecto al sustrato nativo para las relaciones g de Cl₂ /g de sustrato de 0,7 y 0,9 respectivamente. Estos valores son similares a los obtenidos por El-Diwany y col. (1986) sobre cáscara de arroz tratada con clorito sódico.

El incremento de la eficacia de sacarificación, con respecto al sustrato no tratado, fue de 2,15 y 2,46 para las dos condiciones estudiadas. Los datos recogidos en la bibliografía con respecto al incremento de este índice por efecto del tratamiento con hipoclorito sódico muestran valores diferentes, dependiendo del tipo de sustrato. Así, por ejemplo, el bagazo de caña de azúcar experimenta un incremento de la eficacia de sacarificación desde 1,5%

g Cl ₂ /g sustrato	% RECUPERACION MATERIAL INICIAL (r)*		% GLUCOSA		% AZUCARES REDUCTORES		% LIGNINA	
	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
0,7	70,27	(1,31)	27,10	(1,70)	47,26	(3,35)	15,40	(4,37)
0,9	70,35	(2,12)	25,14	(1,67)	48,84	(2,19)	13,40	(2,72)

TABLA XXV. Porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) después del pretratamiento (r) y composición de los residuos sólidos para las distintas condiciones de pretratamiento oxidante con hipoclorito sódico.
Vm = valor medio.
Cv = coeficiente de variación (%).
n* = 2, n = 4.

g Cl ₂ /g sustrato	% RECUPERACION GLUCOSA		% RECUPERACION AZUCARES REDUCTORES		% RECUPERACION LIGNINA	
	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
0,7	77,09	(1,19)	78,35	(3,81)	68,71	(0,36)
0,9	71,59	(1,05)	81,05	(2,58)	59,86	(3,94)

TABLA XXVI. Efecto del pretratamiento oxidante con hipoclorito sódico en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina.
Vm = valor medio.
Cv = coeficiente de variación (%).
n = 4.

g Cl ₂ /g sustrato	mg G lucosa/100 mg sustrato Gp		mg Azúcares Reductores/100 mg sustrato		CC (%)		ES(%)		g Glucosa/kg sustrato nativo
	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	
0,7	11,88	(3,41)	21,88	(2,97)	33,83	(2,61)	47,25	(1,94)	83,56
0,9	14,69	(2,42)	21,88	(0,65)	41,77	(2,12)	54,19	(1,54)	103,18

TABLA XXVII. Efecto del pretratamiento oxidante con hipoclorito sódico en el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = valor medio.

Cv = coeficiente de variación (%).

n = 4

para el sustrato nativo hasta 67% para el pretratado, mientras que, el tallo de algodón aumenta desde 0,6% hasta el 29% en el caso del sustrato pretratado. Tales variaciones en el comportamiento de los distintos sustratos podrían relacionarse con la estructura físico-química de los constituyentes celulósicos y con la especificidad enzimática por el sustrato (Naim y col., 1986)

4.2.2.4. Pretratamiento ácido.

La utilización de ácido sulfúrico diluido (0,2-2%) a temperaturas moderadas (100-140°C) en el tratamiento prehidrolítico de la madera, fue propuesto por Schöller en 1923 como modificación de su sistema de percolación a presión (Schöller, 1961). Posteriormente tanto ácidos minerales como orgánicos han sido empleados satisfactoriamente en los pretratamientos de diferentes sustratos lignocelulósicos. La acción principal de los ácidos diluidos a temperatura moderada sobre la lignocelulosa es la de solubilizar la fracción de hemicelulosa permaneciendo prácticamente inalterado su contenido en lignina y celulosa. Estos pretratamientos son así aconsejables para los materiales con un gran contenido en hemicelulosas y, son aplicadas como fase inicial o prehidrólisis de los procesos de hidrólisis de materiales lignocelulósicos para obtener un máximo aprovechamiento de azúcares.

La prehidrólisis de madera de álamo y paja de trigo con ácido sulfúrico a temperatura moderada (120-160°C) y alta temperatura (180-230°C) se ha descrito como un pretratamiento eficaz para aumentar la digestibilidad de la celulosa por el complejo enzimático producido por mutantes del hongo *Trichoderma reesei* (Grohmann y col., 1984; 1985; 1987; 1989; Grethlein y col., 1984; Torget y col., 1990).

En general, se ha descrito que este tipo de pretratamiento es eficaz para el caso de maderas duras y no en el caso de maderas blandas (Grethlein y col., 1984).

Según Grethlein (1985) el pretratamiento con ácido diluido crea poros en la madera, los cuales son suficientemente grandes como para que puedan penetrar las moléculas de enzima y de esta forma acceder a la fibra de celulosa. Estos poros se producen probablemente por eliminación de la hemicelulosa y condensación con la lignina.

Wilke y col. (1981), recomiendan la utilización de 0,9% de H₂SO₄ para la eliminación de las hemicelulosas de zuros de maíz y para distintas pajas, previa a la hidrólisis enzimática. Cuando este tratamiento se lleva a cabo a 100°C durante 5 horas y media, el 40-80% de los pentosanos se transforma en pentosas. La producción de hexosas por hidrólisis enzimática aumenta del 20 al 70% sobre la obtenida sin pretratamiento.

En nuestro caso el pretratamiento de *O.nervosum* en medio ácido se ha llevado a cabo utilizando ácido clorhídrico, sulfúrico y acético en distintas condiciones de concentración y temperatura.

4.2.2.4.1. Pretratamiento con ácido clorhídrico.

En la tablas XXVIII, XXIX y XXX se recogen los resultados obtenidos en cuanto a recuperación de material inicial (r) y rendimientos de la hidrólisis enzimática para los distintos condiciones de tratamiento.

Para el tratamiento realizado a 25°C el rango de recuperación de sólidos fue de 70-75,5%, mientras que para el realizado a 100°C, fue de 34,5-55,5%.

Con respecto a la producción de glucosa (expresado como mg/100 mg de sustrato), no se producen aumentos significativos con respecto a la obtenida por hidrólisis enzimática del cardo nativo (alrededor de 8 mg/100 mg sustrato) para los pretratamientos realizados a 25°C. A medida que se aumenta la temperatura de pretratamiento, concentración de ácido utilizado y tiempo de tratamiento, la producción de glucosa por hidrólisis enzimática aumenta, llegándose en las condiciones más favorables (100°C, 5% HCl y 5 h.) a multiplicarse por 2,4 con respecto al sustrato nativo. Sin embargo, si se tienen en cuenta las pérdidas de material que se producen por el efecto del pretratamiento, se obtuvieron rendimientos expresados como porcentaje de conversión de celulosa en glucosa similares al obtenido sin tratar (25,8%).

En las condiciones más favorables de pretratamiento con ácido clorhídrico en el rango estudiado (1% HCl, 100 °C y 5 horas) se obtuvo una recuperación de sólidos del 50%, una producción de glucosa por hidrólisis enzimática de 17,37 mg/100 mg sustrato y una eficiencia de sacarificación del 27.78%.

4.2.2.4.2. Pretratamiento con ácido sulfúrico.

En la tabla XXXI se recogen los resultados obtenidos para el tratamiento con ácido sulfúrico en las diferentes condiciones estudiadas. El rango de recuperación de material inicial (r) obtenido fue de 45,4-71,4%.

Con respecto a la producción de azúcares por hidrólisis enzimática a bajas concentraciones de H₂SO₄ (0,2 y 0,5%) no se obtuvo aumento significativo, mientras que a concentraciones de ácido más elevadas 1 y 5% la producción aumentó obteniéndose un incremento del 80% con respecto al sustrato nativo. En el caso de la utilización de ácido sulfúrico, el efecto sobre la conversión de celulosa en glucosa es más evidente, obteniéndose en todos los casos valores de conversión menores que el correspondiente al sustrato sin tratar debido a las pérdidas de material que se producen por efecto del pretratamiento.

4.2.2.4.3. Pretratamiento con ácido acético.

En la tabla XXXII, se recogen los valores obtenidos para cada una de las condiciones estudiadas. La recuperación de material inicial es mayor que en el caso del ácido clorhídrico y sulfúrico, el rango obtenido fue de 62-77%. La producción de glucosa, en general, es menor

CONDICIONES		% RECUPERACION MATERIAL INICIAL (r)	RENDIMIENTO HIDROLISIS ENZIMATICA			
CONCENTRACION (%)	TIEMPO (horas)		mg Glucosa/100 mg sustrato Gp Vm Cv	mg Azúcares Reductores/100 mg sustrato Vm Cv	% Conversión de celulosa en glucosa CC Vm Cv	g Glucosa/Kg sustrato nativo
0,5	1	74,50	8,61 (1,74)	10,15 (5,38)	20,72 (1,74)	64,14
	3	75,50	8,68 (9,55)	9,03 (7,79)	20,20 (10,0)	65,53
	5	71,50	8,80 (4,67)	11,09 (8,41)	20,33 (4,67)	62,92
1	1	75,00	7,64 (7,33)	8,94 (9,61)	18,52 (7,33)	57,30
	3	75,50	8,78 (1,20)	12,15 (7,81)	21,41 (1,20)	66,29
	5	74,50	10,10 (7,09)	11,59 (12,2)	24,33 (7,09)	75,32
5	1	70,50	9,56 (2,97)	12,20 (5,86)	21,76 (2,97)	67,40
	3	70,00	8,90 (1,11)	12,24 (6,35)	20,13 (1,11)	62,30
	5	70,00	9,55 (4,41)	11,34 (6,90)	21,58 (4,41)	66,85

TABLA XXVIII. Efecto del pretratamiento con ácido clorhídrico a 25°C sobre: recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%).

n = 4

CONDICIONES		% RECUPERACION MATERIAL INICIAL (r)	RENDIMIENTO HIDROLISIS ENZIMATICA			
CONCENTRACION (%)	TIEMPO (horas)		mg Glucosa/100 mg sustrato Gp Vm Cv	mg Azúcares Reductores/100 mg sustrato Vm Cv	% Conversión de celulosa en glucosa CC Vm Cv	g Glucosa/Kg sustrato nativo
0,5	1	65,50	9,33 (1,04)	11,43 (4,55)	19,73 (1,04)	61,11
	3	65,00	11,78 (9,17)	11,25 (7,56)	24,74 (9,17)	76,57
	5	64,00	10,24 (6,97)	11,38 (5,53)	21,16 (6,97)	65,54
1	1	64,50	9,00 (11,1)	13,83 (2,09)	18,76 (11,0)	58,05
	3	62,50	10,18 (1,6)	11,48 (7,72)	20,56 (1,60)	63,62
	5	61,50	10,18 (1,63)	12,37 (11,5)	20,23 (1,63)	62,61
5	1	57,50	10,50 (2,70)	13,95 (1,75)	19,49 (2,70)	60,37
	3	55,50	10,30 (7,60)	13,68 (5,29)	18,46 (7,60)	57,16
	5	53,50	14,17 (4,27)	13,02 (2,75)	24,48 (4,29)	75,81

TABLA XXIX Efecto del pretratamiento con ácido clorhídrico a 70°C sobre: recuperación de sustrato inicial (expresado como peso seco) (r) y rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación

n = 4

CONDICIONES		% RECUPERACION MATERIAL INICIAL (r)	RENDIMIENTO HIDROLISIS ENZIMATICA			
CONCENTRACION (%)	TIEMPO (horas)		mg Glucosa/100 mg sustrato Gp Vm Cv	mg Azúcares Reductores/100 mg sustrato Vm Cv	% Conversión de celulosa en glucosa CC Vm Cv	g Glucosa/Kg sustrato nativo
0,5	1	55,50	9,04 (11,4)	10,52 (5,84)	16,20 (11,4)	50,17
	3	55,50	11,14 (2,14)	12,59 (4,13)	19,97 (2,14)	61,83
	5	51,50	8,43 (7,75)	9,61 (8,13)	14,03 (7,75)	43,41
1	1	55,50	11,07 (1,40)	13,34 (7,47)	19,67 (1,40)	61,44
	3	49,50	15,99 (2,06)	16,75 (4,12)	25,57 (2,06)	79,15
	5	49,50	17,37 (2,23)	17,18 (5,27)	27,78 (2,23)	85,98
5	1	44,50	18,07 (2,57)	20,16 (8,51)	25,68 (2,57)	80,41
	3	41,50	18,68 (4,81)	23,07 (6,64)	25,04 (4,81)	77,52
	5	34,50	19,21 (4,57)	23,29 (1,50)	21,40 (4,57)	66,27

TABLA XXX Efecto del pretratamiento con ácido clorhídrico a 100°C sobre: recuperación de sustrato inicial (expresado como peso seco) (r) y rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n = 4

CONDICIONES		RECUPERACION MATERIAL INICIAL (r)*	%	RENDIMIENTO HIDROLISIS ENZIMATICA			
CONCENTRACION (%)	TIEMPO (horas)			mg Glucosa/100 mg sustrato Gp Vm Cv	mg Azúcares Reductores/100 mg sustrato Vm Cv	% Conversión de celulosa en glucosa CC Vm Cv	g Glucosa/Kg sustrato nativo
0,2	1		71,4	5,82 (4,77)	12,29 (6,04)	13,42 (4,77)	41,55
	3		67,3	8,52 (7,24)	11,18 (4,07)	18,52 (7,24)	57,34
	5		65,3	9,97 (3,53)	11,18 (8,55)	21,18 (3,53)	65,10
0,5	1		60,1	8,92 (5,64)	11,25 (8,59)	17,32 (5,64)	53,61
	3		60,1	8,77 (7,70)	11,63 (5,85)	17,03 (7,70)	52,71
	5		53,8	9,82 (3,29)	12,32 (1,70)	17,06 (3,29)	52,83
1	1		57,6	9,45 (5,96)	13,41 (3,88)	17,58 (5,96)	54,43
	3		54,9	11,01 (5,23)	14,55 (3,55)	19,53 (5,23)	60,44
	5		55,4	12,94 (5,80)	14,93 (1,95)	23,15 (5,80)	71,69
5	1		55,4	9,56 (1,43)	15,55 (1,87)	17,11 (1,43)	52,96
	3		49,0	13,79 (2,18)	20,68 (1,28)	21,83 (2,18)	67,57
	5		45,4	14,75 (3,22)	20,07 (3,29)	21,62 (3,22)	66,96

TABLA XXXI Efecto del pretratamiento con ácido sulfúrico a 100°C sobre: recuperación de sustrato inicial (expresado como peso seco) (r) y rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%).

n = 4.

CONDICIONES			% RECUPERACION MATERIAL INICIAL (r)	RENDIMIENTO HIDROLISIS ENZIMATICA			
TEMPERATURA (°C)	CONCEN- TRACION (%)	TIEMPO (horas)		mg Glucosa/100 mg sustrato Gp Vm Cv	mg Azúcares Reductores/100 mg sustrato Vm Cv	% Conversión de celulosa en glucosa CC Vm Cv	g Glucosa/Kg sustrato nativo
70	1	1	77,0	12,88 (4,93)	16,28 (3,30)	32,03 (4,93)	99,18
	1	3	74,0	15,93 (0,86)	20,77 (2,80)	38,06 (0,86)	117,85
	1	5	73,5	11,21 (0,79)	14,96 (1,10)	26,61 (0,79)	82,39
	5	3	75,5	12,86 (1,41)	18,72 (3,36)	31,36 (1,41)	97,08
	5	5	73,0	12,61 (4,90)	17,80 (3,41)	29,72 (4,90)	92,02
100	1	1	68,0	9,76 (0,45)	20,26 (1,68)	21,44 (0,45)	66,37
	1	3	65,5	14,97 (5,90)	20,29 (5,08)	31,67 (5,90)	98,05
	1	5	63,0	10,47 (7,38)	14,95 (1,89)	21,31 (7,38)	65,97
	5	1	64,5	10,43 (0,92)	14,64 (0,76)	21,73 (0,92)	67,29
	5	3	61,5	7,88 (8,62)	13,12 (4,35)	15,66 (8,62)	48,49
	5	5	62,0	9,58 (4,16)	13,50 (4,34)	19,18 (4,16)	59,38

TABLA XXXII. Efecto del pretratamiento con ácido acético sobre: recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%).

n = 4.

que en los casos anteriores, sin embargo se obtienen mayores conversiones de celulosa en glucosa (%) debido a la menor pérdida de material por efecto del tratamiento, especialmente en el caso del tratamiento a 70°C.

En las condiciones más favorables (70°C, 1% y 3 horas), la recuperación de sólidos fue del 74,0%, la producción de glucosa de 15,9 mg /100 mg sustrato, obteniéndose una eficiencia de sacarificación del 38,06% que corresponde a un incremento del 48% con respecto al sustrato sin tratar.

De los resultados obtenidos puede concluirse que al menos en el intervalo de condiciones estudiadas para los tres tipos de ácidos utilizados, no se favorece la eficacia global del proceso de hidrólisis enzimática.

4.2.2.5. Pretratamiento con radiación gamma.

Diversos autores han estudiado el efecto del tratamiento con radiación γ sobre la digestibilidad de subproductos agrícolas y agroindustriales (Han y col., 1983a, Khan y col., 1986; Kumakura y Kaetsu, 1978; Saeman y col., 1952). La mayoría de estos estudios coinciden en afirmar que el efecto más importante de la radiación γ a dosis elevadas, del orden de 10^7 rad (100 KGy), es la disminución del grado de polimerización de la celulosa y una solubilización de una considerable proporción de los materiales lignocelulósicos. La irradiación produce una despolimerización oxidativa de la celulosa tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (Phillips y Arthur, 1985). Además, las roturas originadas por el efecto de la radiación sobre las cadenas celulósicas, facilitan el anclaje y posterior actuación de las enzimas celulolíticas. Sin embargo, el efecto final depende fundamentalmente del sustrato utilizado; así, por ejemplo, las experiencias de irradiación llevadas a cabo sobre el bagazo de caña de azúcar, muestran un aumento del rendimiento en azúcares en la hidrólisis enzimática de dicho bagazo irradiado con dosis de 10 Mrad (100 KGy) o superiores. Con dosis de 100 Mrad, el rendimiento se triplica con respecto al sustrato no irradiado (Han y Ciegler, 1982). Los trabajos realizados por Kumakura y Kaetsu (1982, 1983) demuestran la eficacia del tratamiento por irradiación en la mejora de la hidrólisis enzimática de sustratos tales como bagazo, paja de arroz, serrín de cedro y residuos de papel, encontrando el óptimo de digestibilidad cuando se irradió a $5 \cdot 10^8$ rad, mientras que el óptimo de digestibilidad encontrado para la paja de trigo es de $2,5 \cdot 10^8$ rad (Pritchard y col., 1962). Fan y col. (1987) estudiaron el efecto de la irradiación sobre Solka Floc, encontrando que el principal efecto era el aumento de la superficie específica como consecuencia de una despolimerización de la celulosa, que no iba acompañada de cambios en el índice de cristalinidad. Otros autores han comprobado que la presencia de cloro al irradiar la paja de trigo acelera la degradación de la celulosa con la consiguiente reducción de la dosis necesaria para conseguir los mismos incrementos de digestibilidad (Kumakura y Kaetsu, 1979). Los resultados no son, sin embargo, muy espectaculares y en cambio resultan poco prácticos para realizarlos a gran escala.

A pesar de los distintos resultados encontrados para los distintos materiales, se puede generalizar diciendo que con radiación gamma se necesitan dosis comprendidas entre 10 y 100 Mrad para obtener un aumento significativo del rendimiento en la hidrólisis del material irradiado.

Uno de los principales problemas en la utilización de este tipo de pretratamiento es su alto coste. Por este motivo, se ha concedido gran importancia al estudio de la posibilidad de aprovechamiento de los residuos de Cesio-137 obtenidos en Centrales Nucleares, que permitirían el abaratamiento de este proceso.

Estudios previos sobre el efecto de la preirradiación sobre la hidrólisis ácida realizados sobre *Onopordum nervosum* (Suárez y col., 1983), han mostrado un aumento en el rendimiento de hidrólisis ácida del sustrato irradiado. Por este motivo, se decidió estudiar el efecto de la preirradiación del cardo sobre la hidrólisis enzimática de dicho sustrato. El pretratamiento se llevó a cabo sobre el material lignocelulósico suspendido en un medio acuoso con objeto de comprobar si el efecto adicional de los radicales libres generados por hidrólisis del agua permitía obtener buenos resultados empleando dosis más bajas. Con este mismo objetivo se ha estudiado el efecto de la adición de ácido al medio de irradiación, tal como sugieren algunos autores para sustratos de composición similar al *Onopordum nervosum*. Asimismo, se ha estudiado el efecto combinado de irradiación y posterior tratamiento con ácidos diluidos.

Recuperación de material inicial.

El efecto sobre la solubilización fue evaluado por pérdida de peso seco después de realizar el pretratamiento.

En la figura 36 se encuentran recogidos los valores de porcentaje de solubilización obtenidos para cada uno de los tratamientos de irradiación realizados en los distintos medios (agua, ácido sulfúrico, ácido acético y ácido clorhídrico). A la vista de los resultados obtenidos, podríamos deducir el escaso efecto de la adición de ácido en el medio de irradiación, como potenciador de la solubilización por efecto del tratamiento. Solamente a dosis bajas (20 Mrad) y en el caso de adición de ácido sulfúrico o clorhídrico se observa un incremento de la solubilización.

Cuando se realizó un pretratamiento combinado (irradiación previa y posterior tratamiento ácido) tanto si la muestra fue preirradiada en seco o en agua, la solubilidad aumentó con respecto al tratamiento de irradiación en una única fase, obteniéndose los valores más elevados en el caso del tratamiento posterior con ácido clorhídrico y sulfúrico. En el caso de tratamiento de radiación en medio acuoso y posterior tratamiento ácido, la solubilización total producida se puede descomponer en dos factores, la solubilización correspondiente a la primera fase y debida al efecto de la radiación y, aquella correspondiente a la segunda fase debida a la acción de los distintos ácidos. Teniendo en cuenta este hecho, se ha confeccionado con los datos obtenidos, la figura 37 en la que aparece la solubilización debida únicamente a la segunda fase del tratamiento con ácidos. Se puede observar que para cada tipo de ácido empleado ésta es muy similar para las tres dosis de irradiación aplicadas, lo cual indicaría

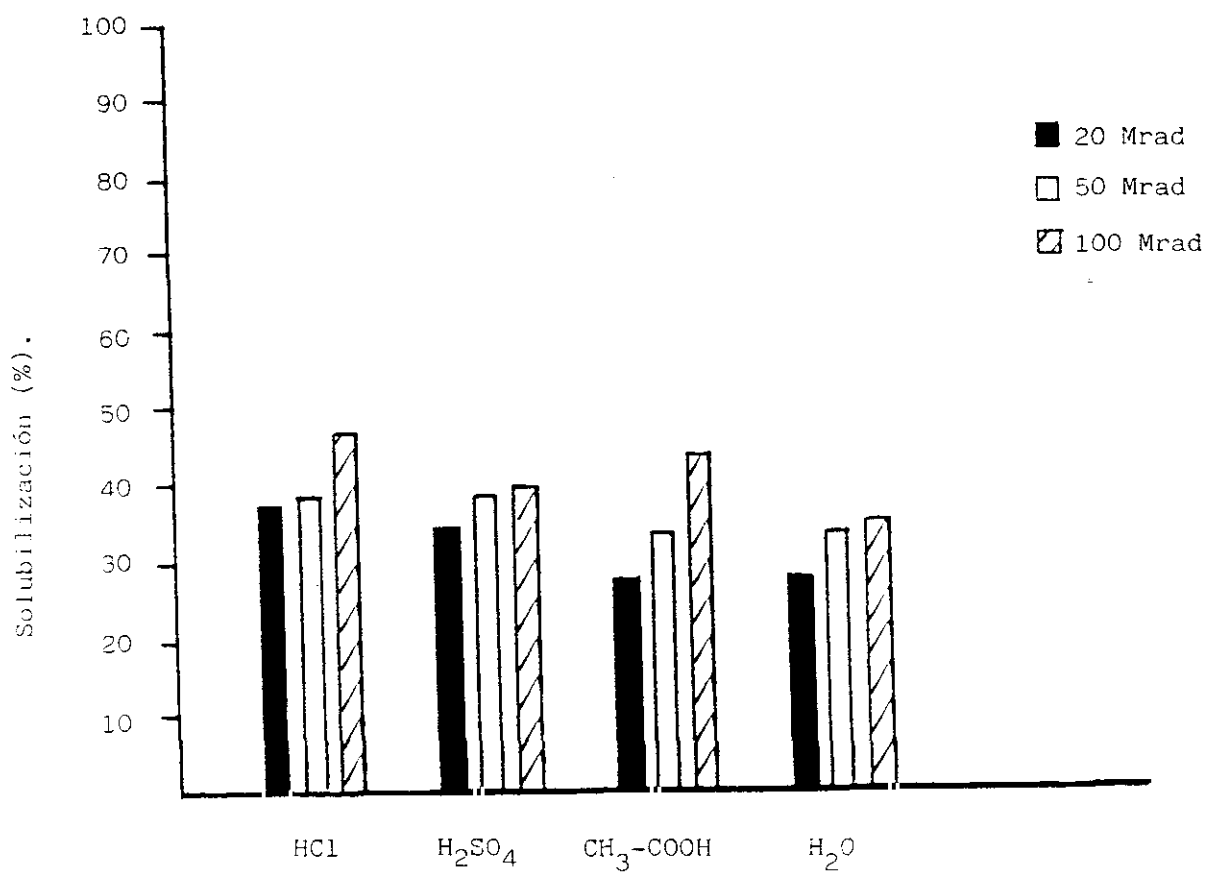


Figura 36. Influencia de la dosis de irradiación gamma en la solubilización del sustrato *O.nervosum* en diferentes medios.

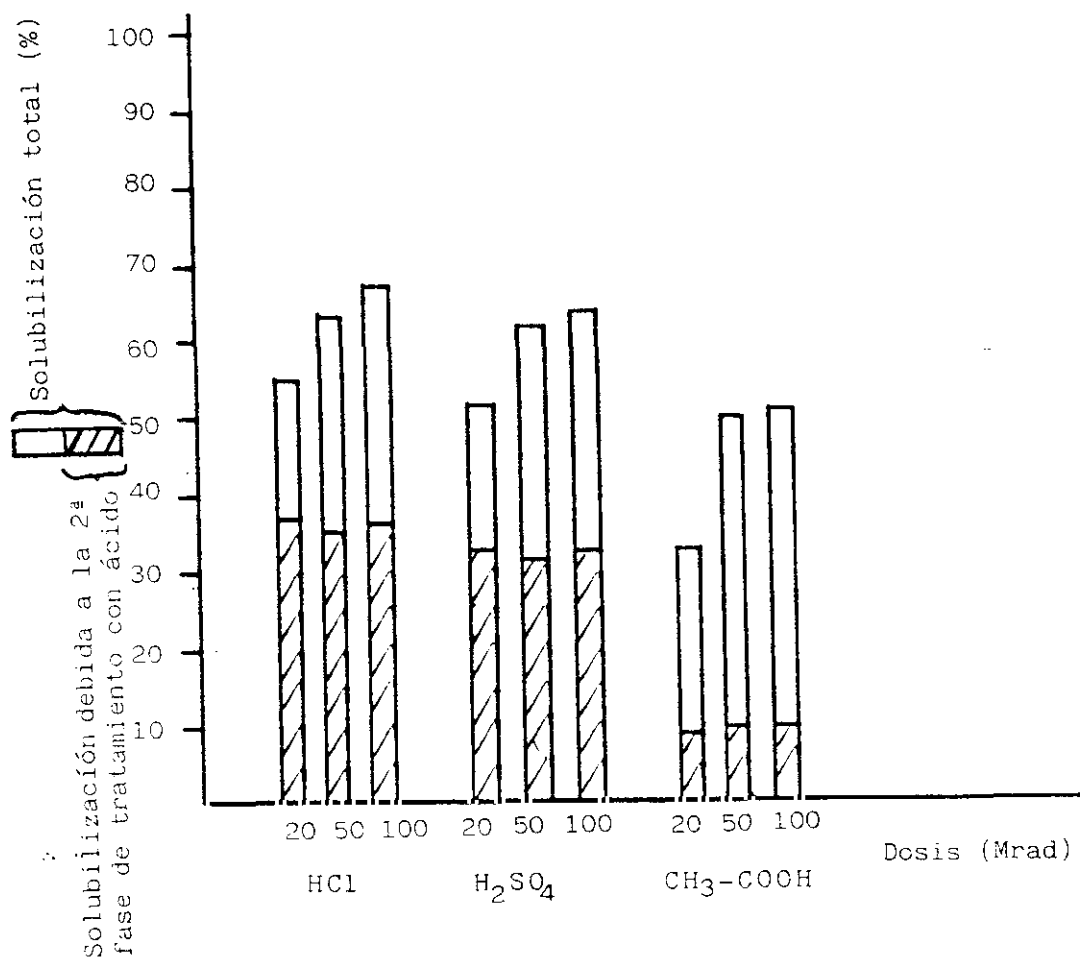


Figura 37. Influencia de la dosis de irradiación gamma en la solubilización del sustrato *O. nervosum* con diferentes ácidos.

que el efecto del tratamiento ácido no se potenciaría por la dosis de irradiación recibida. Sin embargo, cuando la muestra se irradió previamente en aire, se observó un aumento de la solubilización a medida que aumentaba la dosis de irradiación.

Recuperación de celulosa y lignina.

En la tabla XXXIII se recogen los valores de composición de los residuos obtenidos después del pretratamiento de irradiación en los distintos medios (agua y ácido) y para las distintas dosis de irradiación ensayadas (20, 50 y 100 Mrad), mientras que en la tabla XXXIV se recogen aquellos valores correspondientes al tratamiento combinado de irradiación y posterior tratamiento ácido (pretratamiento en dos fases).

La acción del pretratamiento sobre la celulosa y lignina se expresa como recuperación de celulosa (considerando el 100% el contenido en celulosa del material inicial) y porcentaje de recuperación de lignina. En las tablas XXXV y XXXVI se recogen los valores obtenidos en cuanto a recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina de los pretratamientos realizados en una única fase y en dos fases respectivamente. En el anexo III, se recogen los análisis de varianza según un diseño factorial 2x4 para comparar los datos de porcentaje de recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina, en los distintos pretratamientos de irradiación (pretratamiento en una fase), así como el análisis de varianza según un diseño factorial 3x2x3 correspondiente al tratamiento combinado irradiación y posterior tratamiento ácido (tratamiento en dos fases).

Con el tratamiento de irradiación, a medida que aumentamos la dosis de irradiación, la recuperación de celulosa es menor, llegándose solamente al $45,22 \pm 1,62$ en las condiciones más drásticas (tratamiento en medio acuoso a 100 Mrad y posterior tratamiento con ácido clorhídrico). En general, la recuperación de celulosa es mayor cuando únicamente se somete el sustrato a irradiación, que cuando el sustrato irradiado es sometido posteriormente al efecto de los distintos ácidos.

Cuando se comparan los valores obtenidos de recuperación de celulosa para los distintos medios en que se realizó la irradiación (tabla XXXV) se observa una disminución muy significativa ($p \leq 0,01$) de dicho porcentaje de recuperación a medida que aumenta la dosis, dependiendo tanto de la dosis como del tipo de medio utilizado, aunque no se encuentran diferencias significativas entre el ácido clorhídrico y sulfúrico en cuyos casos las recuperaciones (expresadas en porcentaje) son significativamente más elevadas que en el caso del tratamiento en medio acuoso o en medio acidificado con ácido acético, teniendo éstas dos últimas un comportamiento similar.

Si se comparan los pretratamientos combinados de irradiación y posterior tratamiento ácido, pretratamiento en dos fases (tabla XXXVI), se observa una influencia significativa de los tres factores estudiados (dosis de irradiación, medio en el que se realizó la irradiación previa (agua/aire) y tipo de ácido utilizado en el pretratamiento combinado posterior, siendo el efecto combinado dosis de irradiación-medio y medio-tipo de ácido, significativo ($p \leq 0,05$).

CONDICIONES		% RECUPERACION DE MATERIAL INICIAL (r)	COMPOSICION					
Medio	Dosis (Mrad)		% GLUCOSA		% AZUCARES REDUCTORES		% LIGNINA	
			Vm	Cv	Vm	CV	Vm	Cv
A. Clorhídrico	20	63,31	38,31	(7,47)	47,74	(3,38)	22,03	(1,03)
	50	60,87	33,80	(1,43)	43,97	(1,76)	20,45	(9,03)
	100	53,32	34,94	(7,42)	41,82	(4,66)	26,54	(1,24)
A. Sulfúrico	20	65,32	30,74	(4,68)	48,54	(1,39)	20,79	(1,88)
	50	61,13	40,23	(1,23)	50,42	(1,41)	22,72	(8,91)
	100	59,48	37,45	(3,44)	44,47	(3,29)	25,89	(1,12)
A. Acético	20	73,44	30,57	(1,89)	52,14	(1,65)	17,24	(4,26)
	50	66,30	32,66	(3,57)	49,64	(2,24)	19,14	(11,4)
	100	55,34	28,94	(4,31)	47,91	(4,89)	19,59	(1,06)
Agua	20	72,74	33,89	(5,36)	51,95	(1,11)	22,13	(9,33)
	50	66,02	32,90	(6,03)	52,95	(1,04)	24,19	(3,24)
	100	54,64	30,04	(1,91)	54,72	(1,88)	28,24	(1,99)

TABLA XXXIII. Porcentaje de recuperación del material inicial (expresado como peso seco) después del pretratamiento (r) y composición de los residuos sólidos obtenidos para las distintas condiciones de pretratamiento con irradiación ensayadas.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n = 4.

CONDICIONES		% RECUPERACION DE MATERIAL INICIAL (r)	COMPOSICION					
Dosis (Mrad)	Tratamiento ácido posterior		% GLUCOSA		% AZUCARES REDUCTORES		% LIGNINA	
			Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
20	Acido Clorhídrico	44,50	49,11	(2,36)	58,80	(1,09)	31,89	(2,11)
50		36,19	44,19	(3,80)	52,42	81,33)	40,74	(2,30)
100		33,48	44,67	(3,58)	52,69	(1,06)	40,39	(2,33)
20*		47,76	45,41	(3,97)	57,74	(1,98)	28,13	(1,78)
50*		37,70	47,06	(6,07)	54,55	(1,72)	23,06	(3,83)
100*		35,91	50,27	(2,74)	58,23	(1,24)	29,39	(2,59)
20	Acido Sulfúrico	48,53	45,48	(5,86)	50,74	(1,36)	31,51	(3,44)
50		38,98	45,42	(5,79)	48,23	(1,66)	31,49	(6,37)
100		36,18	44,50	(2,32)	49,07	(3,87)	34,76	(5,15)
20*		51,88	52,39	(6,39)	58,04	(5,60)	25,88	(7,52)
50*		40,94	45,97	(6,48)	55,80	(2,06)	24,40	(2,31)
100*		39,18	43,24	(4,95)	49,93	(3,18)	30,64	(2,93)
20	Acido Acético	67,38	29,80	(2,15)	51,57	(2,38)	20,54	(2,35)
50		50,09	35,73	(4,32)	49,77	(5,31)	28,79	(2,45)
100		49,14	34,44	(1,48)	53,41	(3,46)	29,19	(9,12)
20*		72,23	35,28	(1,79)	56,56	(2,70)	21,59	(3,22)
50*		50,47	38,39	(1,53)	55,58	(4,54)	27,70	(1,53)
100*		68,71	32,48	(2,99)	51,06	(3,83)	18,89	(3,79)

TABLA XXXIV. Porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) después del pretratamiento (r) y composición de los residuos sólidos obtenidos para las distintas condiciones de pretratamiento combinado de irradiación y posterior tratamiento ácido.

* las muestras fueron irradiadas previamente en seco.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n = 4

CONDICIONES		% RECUPERACION GLUCOSA		% RECUPERACION AZUCARES REDUCTORES		% RECUPERACION LIGNINA	
Medio	Dosis (Mrad)	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
A. Clorhídrico	20	73,04	(7,47)	60,87	(3,38)	88,05	(1,03)
	50	61,97	(1,43)	53,91	(1,76)	78,58	(9,30)
	100	56,12	(7,42)	44,91	(4,66)	89,34	(1,24)
A. Sulfúrico	20	60,47	(4,68)	63,86	(1,39)	85,74	(1,88)
	50	74,07	(1,23)	62,08	(1,41)	87,68	(8,92)
	100	67,09	(3,44)	53,27	(3,29)	97,24	(1,12)
A. Acético	20	67,62	(1,89)	77,14	(1,65)	79,93	(4,26)
	50	65,22	(3,57)	66,28	(2,24)	80,11	(11,4)
	100	48,23	(4,31)	53,39	(4,88)	68,44	(1,06)
Agua	20	74,26	(5,36)	76,10	(1,11)	101,6	(9,33)
	50	65,43	(6,03)	70,42	(1,04)	100,8	(3,24)
	100	49,44	(1,91)	60,22	(1,88)	97,42	(1,99)

Tabla XXXV. Efecto del pretratamiento de irradiación en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina.
Vm = valor medio
Cv = coeficiente de variación (%)
n = 4

CONDICIONES		% RECUPERACION GLUCOSA		% RECUPERACION AZUCARES REDUCTORES		% RECUPERACION LIGNINA	
Dosis (Mrad)	Pretatamiento ácido posterior	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
20	Acido Clorhídrico	65,82	(2,36)	52,19	(1,09)	88,74	(2,11)
50		48,16	(3,80)	38,21	(1,33)	93,08	(2,30)
100		45,22	(3,58)	35,53	(1,07)	85,37	(2,33)
20*		65,31	(3,97)	55,55	(1,98)	84,83	(1,78)
50*		53,44	(6,07)	41,42	(1,72)	54,88	(3,83)
100*		54,97	(2,74)	42,12	(1,24)	66,63	(2,59)
20	Acido Sulfúrico	66,49	(5,86)	49,59	(1,36)	96,55	(3,44)
50		53,33	(5,79)	37,87	(1,66)	77,49	(6,37)
100		48,47	(2,33)	35,76	(3,87)	79,40	(5,15)
20*		81,86	(6,39)	60,64	(5,60)	84,76	(7,52)
50*		56,69	(6,48)	46,01	(2,06)	63,06	(2,31)
100*		50,63	(4,95)	39,39	(3,18)	75,78	(2,92)
20	Acido Acético	60,48	(2,15)	69,99	(2,38)	87,37	(2,35)
50		53,90	(4,32)	50,21	(5,31)	91,04	(2,45)
100		50,85	(1,48)	52,86	(3,46)	90,55	(9,12)
20*		76,76	(1,79)	82,29	(2,70)	98,45	(3,22)
50*		58,36	(1,53)	56,50	(4,54)	88,48	(1,53)
100*		67,21	(2,59)	70,67	(3,82)	81,94	(3,79)

TABLA XXXVI. Efecto del pretratamiento combinado irradiación y posterior tratamiento ácido en la recuperación de glucosa azúcares reductores y lignina.

* las muestras fueron irradiadas previamente en seco.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación

n = 4

y muy significativo el efecto dosis-medio ($p \leq 0,01$). A medida que aumenta la dosis, la recuperación de celulosa es menor aunque, en general, no se observan diferencias significativas cuando el material fue irradiado a 50 y 100 Mrad. También se observa que la recuperación fue menor cuando el material fue irradiado previamente en medio acuoso. En general, no se observan diferencias significativas entre el pretratamiento posterior con ácido acético y ácido sulfúrico. En ambos casos las recuperaciones obtenidas fueron mayores que en el tratamiento ácido posterior con ácido clorhídrico.

Con respecto a la deslignificación, cuando el pretratamiento se realizó en una única fase, al comparar los distintos medios donde se llevó a cabo la irradiación no se observa diferencias significativas con respecto a la dosis de irradiación, es decir, la deslignificación es independiente de la dosis aplicada, al menos, en el rango de dosis estudiado (20 a 100 Mrad). Sólo es significativo la influencia del medio utilizado en la irradiación y la interacción de los factores medio-dosis de irradiación. No se produce deslignificación significativa cuando la irradiación se realizó en medio acuoso. En principio, podríamos decir que la irradiación como único efecto no produce deslignificación, en el caso del *Onopordum nervosum*, es decir, es el efecto del ácido el que produce una ligera deslignificación siendo máxima (media del orden del 24%) cuando la irradiación se realizó en medio con ácido acético al 1%, no encontrándose diferencias significativas cuando la irradiación se realizó en ácido sulfúrico o en ácido clorhídrico.

Los resultados encontrados en la bibliografía con respecto al comportamiento de la lignina cuando se irradian materiales de distinto contenido en la misma son muy dispares, pasando del escaso efecto de deslignificación encontrada a dosis de 100 Mrad por Bono y col. (1985) hasta las pérdidas significativas de lignina descritas por Han y Ciegler (1982) sobre bagazo de caña de azúcar.

Cuando se compara el efecto combinado irradiación y posterior tratamiento ácido (tratamiento en dos fases), no se observan diferencias significativas entre los pretratamientos realizados a 50 y 100 Mrad. La deslignificación es, en general, mayor cuando el tratamiento previo de irradiación se llevó a cabo en seco. No se observan además diferencias significativas entre el pretratamiento posterior con ácido clorhídrico y ácido sulfúrico. La deslignificación producida es mayor con estos dos ácidos que con ácido acético.

Rendimiento en la hidrólisis enzimática.

Producción de glucosa.

En las tablas XXXVII y XXXVIII se encuentran recogidos los valores de glucosa y azúcares reductores producidos a partir de 100 mg de sustrato pretratado después de 48 horas de hidrólisis enzimática. Los resultados del análisis estadístico correspondiente se muestran en el anexo III. Teniendo en cuenta que para el sustrato nativo se obtienen valores de producción de glucosa del 6% (referidos a peso seco), se observa que por efecto de

CONDICIONES		mg Glucosa/ 100 mg sustrato		mg Azúcares Reductores/ 100 mg sustrato		ES (%)	CC (%)	g Glucosa/ Kg sustrato nativo
Medio	Dosis	Gp		Vm	Cv			
A. clorhídrico	20	12,73	(2,92)	37,75	(1,89)	34,99	24,28	80,60
	50	13,29	(1,53)	21,60	(4,73)	39,03	24,37	80,90
	100	12,48	(7,75)	17,40	(4,85)	35,71	20,04	66,54
A. sulfúrico	20	11,29	(3,13)	28,75	(1,41)	34,55	22,21	73,74
	50	13,34	(6,33)	29,56	(2,93)	33,17	24,57	81,55
	100	15,85	(3,03)	29,70	(3,86)	42,34	28,41	94,28
A. acético	20	11,27	(4,18)	28,75	(0,45)	36,86	24,93	82,76
	50	12,97	(9,02)	29,33	(1,65)	39,72	25,91	85,99
	100	11,17	(4,84)	30,00	(2,31)	38,62	18,63	61,81
Agua	20	12,06	(6,89)	18,50	(1,41)	35,59	26,43	87,72
	50	18,99	(2,58)	25,00	(4,18)	57,72	37,77	106,38
	100	17,42	(4,42)	33,29	(3,62)	57,98	28,67	95,18

TABLA XXXVII . Efecto del pretratamiento por irradiación en el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n = 4

CONDICIONES		mg Glucosa/100 mg sustrato		mg Azúcares Reductores/100 mg sustrato		ES(%)	CC (%)	g Glucosa/Kg sustrato nativo
Dosis (Mrad)	Pretratamiento ácido posterior	Vm	Cv	Vm	Cv			
20	Acido Clorhídrico	22,23	(2,76)	27,80	(2,04)	45,27	29,79	98,9
50		17,29	(9,68)	33,12	(1,64)	39,13	18,85	62,5
10		16,31	(2,70)	21,80	(3,70)	36,51	16,45	72,9
20*		21,92	(4,73)	27,50	(2,21)	48,26	31,52	104,7
50*		23,07	(11,5)	38,23	(3,83)	48,77	26,21	87,0
100*		21,68	(3,32)	38,66	(3,40)	42,66	23,45	77,8
20	Acido Sulfúrico	19,61	(2,32)	21,40	(1,51)	43,11	28,66	95,2
50		18,40	(3,13)	31,79	(3,97)	40,51	21,60	71,7
100		17,59	(6,13)	24,00	(3,43)	39,53	19,17	63,6
20*		16,34	(10,0)	26,60	(2,35)	31,18	25,53	84,8
50*		24,12	(2,78)	39,81	(3,83)	52,47	29,75	98,7
100*		18,85	(8,07)	37,50	(4,86)	43,94	22,25	73,8
20	Acido Acético	12,66	(6,22)	33,80	(1,75)	42,50	25,70	85,3
50		18,42	(4,10)	38,79	(4,20)	51,55	27,79	92,3
100		16,36	(4,97)	38,00	(1,40)	47,49	24,21	80,4
20*		13,87	(7,64)	16,00	(2,26)	39,32	30,18	100,2
50*		18,42	(4,98)	31,39	(1,53)	47,96	27,99	92,9
100*		14,96	(4,54)	24,00	(4,67)	46,00	30,95	102,8

TABLA XXXVIII Efecto del tratamiento combinado irradiación y posterior tratamiento ácido en el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = Valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n = 4

*Las muestras fueron previamente irradiadas en seco.

los pretratamientos realizados se produce un incremento en la producción de ésta, llegándose a multiplicar por un factor de 4 en el caso de la irradiación en seco a 50 Mrad y posterior tratamiento con H_2SO_4 ($24,12 \pm 0,67$). Se observa también que la producción de glucosa por hidrólisis enzimática es mayor cuando el pretratamiento con irradiación es completado con un tratamiento ácido posterior, es decir cuando el pretratamiento se realiza en dos fases.

Este incremento en la producción de glucosa por hidrólisis enzimática del sustrato pretratado, nos refleja un aumento de la accesibilidad de las enzimas a la celulosa de la fibra por efecto del pretratamiento. Si se observan los valores de composición de los residuos (tablas XXXIII y XXXIV) encontramos que, en general, se obtiene una mayor producción de glucosa por hidrólisis enzimática en aquellos sustratos enriquecidos en lignina con respecto al material original. Es decir, se podría pensar, que después de la radiolisis gamma, la mayor accesibilidad a la celulosa no es debida a la deslignificación sino probablemente a cambios en el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa o a un efecto "swelling" tal y como reportan algunos autores (Han y Ciegler, 1982; Han y col., 1983b; Kumakura y col., 1982; Kumakura y Kaetsu, 1984) o a una posible modificación en la relación de los distintos componentes de la fibra.

Existe un comportamiento diferente dependiendo de que se realice el pretratamiento, en una única fase o en dos fases. Así, por ejemplo, si comparamos únicamente el efecto de la irradiación (tratamiento en una fase), la producción aumenta con la dosis, pero a partir de 50 Mrad no se observan diferencias significativas. Sin embargo, si se combina el pretratamiento con un tratamiento ácido posterior (tratamiento en dos fases) se observa un máximo de producción a 50 Mrad.

Eficiencia de sacarificación y conversión de celulosa en glucosa.

Los resultados obtenidos en cuanto a eficiencia de sacarificación (ES%) y conversión de celulosa en glucosa (CC%) están reflejados en la tabla XXXVII para los tratamientos de radiación realizados en una única fase. En el anexo III se recogen los resultados del análisis estadístico correspondiente. Teniendo en cuenta que para el sustrato nativo, el rendimiento de la eficiencia de sacarificación (ES%) es del 22% podemos asegurar que la irradiación incrementa la accesibilidad del sustrato a las enzimas hidrolíticas, obteniéndose valores de hasta $57,72 \pm 2,56$ y $57,98 \pm 1,49$ en los casos de irradiación en medio acuoso con dosis de 50 y 100 Mrad respectivamente. Sin embargo, si el medio acuoso donde se irradia está acidificado con cualquiera de los ácidos estudiados (HCl, H_2SO_4 o $\text{CH}_3\text{-COOH}$ al 1%), se produce una disminución de la sacarificación de forma significativa aunque entre los diferentes ácidos no existen diferencias significativas. Este hecho no coincide con lo encontrado por otros autores, según los cuales, la adición de ácido sulfúrico 0,1N incrementa la producción de azúcares en la hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar (Han y Ciegler, 1982).

Los estudios estadísticos realizados indican que la eficiencia de sacarificación aumenta con la dosis de irradiación aplicada hasta 50 Mrad y por encima de esta dosis, para los valores estudiados, no existen diferencias significativas.

En las experiencias efectuadas por nosotros sobre cardo, se obtiene un aumento del rendimiento de hidrólisis enzimática con la dosis de irradiación de 100 Mrad de 2,6 veces, que es similar al obtenido por Kumakura y Kaetsu (1982) irradiando bagazo de caña de azúcar con la misma dosis. Estos autores obtienen para el mismo sustrato irradiado también a 100 Mrad, un aumento del rendimiento de 4 veces cuando la hidrólisis se efectuó utilizando la vía química (con HCl 0,85%). Para la hidrólisis ácida del *O. nervosum* Suárez y col. (1983) han encontrado, en tallo de cardo, un aumento del rendimiento en azúcares reductores desde el 40% a dosis nula hasta 62% a 50 Mrad, y 65,5% a 100 Mrad. Para la hoja de cardo, el rendimiento en azúcares aumentó desde el 34% a dosis nula hasta el 44% y 50% cuando la hoja se irradió a 10 y 50 Mrad respectivamente. También parece ser, según Kawakishi y col. (1977), que dosis por encima de 100 Mrad son desfavorables porque pueden conducir a una descomposición de oligosacáridos y de la estructura de la glucosa.

Los valores obtenidos de eficiencia de sacarificación (%) y conversión de celulosa en glucosa (%) en el caso del tratamiento de radiación realizado en dos fases (irradiación previa y posterior tratamiento ácido) se recogen en la tabla XXXVIII mientras que en el anexo III se recogen los estudios estadísticos correspondientes a estos datos. Los valores más altos de ambos índices se obtuvieron cuando las muestras fueron previamente irradiadas a 50 Mrad, no encontrándose diferencias significativas entre el pretratamiento posterior con ácido sulfúrico y ácido clorhídrico, y obteniéndose en general mayores eficacias de sacarificación en el caso del tratamiento posterior con ácido acético. Esto tendría la ventaja adicional de ahorro de la fase de lavado posterior al tratamiento ácido, puesto que la hidrólisis enzimática se suele llevar a cabo en tampón acetato pH 4,8.

La acción del ácido, que favorece la producción de glucosa en la hidrólisis, provoca, también, una mayor pérdida de celulosa en el pretratamiento, lo que repercute negativamente en el rendimiento global del proceso (conversión de celulosa en glucosa) obteniéndose en general incrementos no superiores al 30% del valor del porcentaje de conversión de celulosa en glucosa obtenido para el cardo nativo.

Cuando se estudia la acción de los ácidos en el pretratamiento posterior a la irradiación no se encuentra que influya de forma significativa la interacción de los efectos combinados medio-tipo de ácido.

La utilización de la radiación y combinada con ácidos esta descrita en la bibliografía (Kumakura y Kaetsu, 1984) como pretratamiento favorable en el incremento de la hidrólisis enzimática de determinados sustratos lignocelulósicos. Los resultados obtenidos en nuestro caso, ponen de manifiesto, sin embargo, que para la biomasa del *O. nervosum* el tratamiento posterior con ácido solo potencia el efecto de la irradiación en el caso de dosis bajas con 20 Mrad.

En general, se puede decir que aunque la irradiación aumenta significativamente la eficacia de sacarificación (hasta 2,6 veces en el caso más favorable), debido a una pérdida considerable de celulosa como consecuencia de la utilización de este tipo de pretratamiento,

el rendimiento final que se obtiene expresado como conversión de celulosa en glucosa es poco satisfactorio.

Desde el punto de vista económico, los pretratamientos con irradiación del sustrato aquí empleado no resultan aconsejables aún en el caso de utilización de Cesio-137, obtenido en Centrales Nucleares, como fuente de irradiación.

4.2.2.6. Pretratamiento con solventes orgánicos.

La deslignificación con organosolventes fue inicialmente estudiada por Kleinert y Tayenthal (1932) como un nuevo método para la producción de pasta química para la fabricación de papel, con costes sustancialmente menores que los procesos convencionales. Los estudios realizados en este sentido se han llevado a cabo tanto a nivel de laboratorio como a escala piloto utilizando soluciones acuosas de etanol en presencia y en ausencia de catalizadores.

Recientemente, la deslignificación con organosolventes ha cobrado un gran interés como método de pretratamiento de materiales lignocelulósicos para la hidrólisis enzimática, debido a la capacidad de los solventes orgánicos de eliminar la fracción de lignina o una combinación de la fracción de lignina y hemicelulosa (Black y col., 1987; 1989; Chum y col., 1985; 1988; Lee y col., 1987). En general, se ha observado mejor comportamiento con este tipo de pretratamiento sobre biomasa procedente de maderas duras o residuos agrícolas que sobre biomasa procedente de maderas blandas.

En estos pretratamientos, la deslignificación va acompañada de solvolisis y disolución de la fracción de lignina y hemicelulosa, dependiendo de las condiciones del proceso (sistema solvente utilizado, temperatura, diseño del reactor -batch o continuo-, tipo de material inicial) (Holtzapple y Humphrey, 1984). Las condiciones óptimas deben ensayarse para cada tipo de material.

Los principales fenómenos químicos asociados a los procesos con organosolventes son (Sarkanen, 1980):

- hidrólisis de los enlaces internos de la lignina (principalmente α -O-4 éster y en menor proporción los enlaces β -O-4) así como de los enlaces lignina-hemicelulosa (enlaces éster y éster ácido 4-O-metilglucurónico) unido al carbono α de las unidades de lignina.

- hidrólisis de los enlaces glucosídicos en la hemicelulosa y en menor proporción de la celulosa, dependiendo de las condiciones.

- degradación catalizada en medio ácido de los monosacáridos a furfural y 5-hidroximetilfurfural seguido de la reacción de condensación entre la lignina y sus aldehídos reactivos.

El producto final de este tipo de deslignificación produce:

- fibra celulósica que contiene la celulosa original y cantidades variables de lignina y hemicelulosa.

- lignina que puede obtenerse después de eliminar el organosolvente por destilación.

- unidades monoméricas de azúcares procedentes de la fracción de hemicelulosa disueltas en la fracción acuosa.

Así, la eliminación de la fracción de lignina y xilano, facilitaría los procesos posteriores de hidrólisis o sacarificación y fermentación simultánea, puesto que se evitaría la presencia de estos materiales inertes (en general suponen el 30-40% de la capacidad). Además mejoraría la capacidad de reciclado de enzima, dado que se ha descrito que éstas son capaces de adsorberse en la lignina (Sutcliffe y Saddler, 1987).

Por otra parte, la posibilidad de recuperación de estos solventes, hace interesante la aplicación de este tipo de procesos como pretratamiento de la biomasa lignocelulósica. Es conveniente resaltar los trabajos desarrollados por el SERI cuyos objetivos, en la actualidad, son los estudios de pretratamientos con organosolventes como una opción interesante para el fraccionamiento de todos los componentes de la biomasa para su transformación en combustible líquido (Chum y col., 1990).

4.2.2.6.1. Pretratamiento con etanol y butanol como organosolventes.

Se ha estudiado el efecto del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica del *O. nervosum* con dos tipos de solventes orgánicos, etanol y butanol. El pretratamiento se llevó a cabo además en presencia de distintos catalizadores (ácido, base y fenol) descritos en la bibliografía por su efectividad en el tratamiento de sustratos similares al *O. nervosum*.

Recuperación de material inicial.

Los datos relativos al porcentaje de recuperación de material inicial (r) de los distintos pretratamientos realizados con etanol y butanol se muestran en las tablas XXXIX y XL.

Para una misma temperatura y tipo de solvente orgánico utilizado se encontraron mayores recuperaciones cuando se utilizó como catalizador fenol, mientras que éstas fueron menores cuando el catalizador utilizado fue hidróxido sódico.

Recuperación de celulosa y lignina.

CATALIZADOR	TEMPERATURA (°C)	RECUPERACION DEL MATERIAL INICIAL % (r)*		% GLUCOSA		% AZUCARES REDUCTORES		% LIGNINA	
		Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
H ₂ O	120	72,94		39,44	(1,55) ^a	62,36	(3,73) ^a	18,58	(5,55) ^{ab}
	160	54,74	(1,96)	38,49	(2,99) ^a	52,14	(5,04) ^b	21,00	(5,61) ^{ac}
	175	47,23	(0,55)	46,04	(1,26) ^b	59,59	(4,45) ^{ac}	27,58	(2,04)
NaOH	120	56,75	(1,81)	43,36	(0,66) ^b	61,02	(1,49) ^{ad}	19,53	(5,58) ^{ad}
	160	52,41	(8,83)	42,69	(6,08) ^{ab}	55,62	(5,09) ^{bcd}	19,87	(9,55) ^{ae}
H ₂ SO ₄	120	70,33	(2,58)	32,75	(1,90) ^c	49,63	(0,19) ^b	15,40	(5,52) ^b
	160	53,70	(1,18)	43,78	(2,66) ^b	54,29	(4,07) ^{bc}	23,24	(5,92) ^{ce}
Fenol	120	70,29		33,52	(2,24) ^c	54,20	(3,30) ^{bc}	16,25	(8,91) ^{bd}

TABLA XXXIX. Porcentaje de recuperación del material inicial (expresado como peso seco) después del pretratamiento (r) y composición de los residuos sólidos para las distintas condiciones de pretratamiento con etanol.

Vm = Valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n* = 2

n = 4

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes (p ≤ 0,05) n = 4

CATALIZADOR	TEMPERATURA (°C)	% RECUPERACION MATERIAL INICIAL (r)*		% GLUCOSA		% AZUCARES REDUCTORES		% LIGNINA	
		Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
H ₂ O	120	69,30		32,66	(2,99) ^a	52,89	(3,43) ^a	14,65	(3,55) ^a
NaOH	120	58,26	(0,78)	43,33	(0,91) ^b	59,69	(4,02) ^b	17,91	(3,22) ^b
	160	41,92	(0,37)	49,13	(2,31)	58,75	(4,33) ^b	16,04	(3,22) ^{ab}
H ₂ SO ₄	120	73,78	(3,16)	31,53	(3,47) ^a	50,82	(3,32) ^a	16,92	((5,50) ^b
	160	52,99	(3,30)	42,48	(3,13) ^b	51,19	(5,48) ^a	25,96	(3,92)
Fenol	120	69,34		35,06	(2,02) ^a	58,94	(3,84) ^b	13,85	(5,91) ^a

TABLA XL. Porcentaje de recuperación del material inicial (expresado como peso seco) después del pretratamiento (r) y composición de los residuos sólidos para las distintas condiciones de pretratamiento butanol.

Vm = Valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n* = 2

n = 4

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes (p ≤ 0,05)

Los resultados obtenidos de composición en glucosa, azúcares reductores y lignina (expresados como porcentaje) de los residuos sólidos resultantes del tratamiento con etanol y butanol se muestran en las tablas XXXIX y XL. En las tablas XLI y XLII se recogen los resultados del porcentaje de recuperación de los distintos componentes analizados. Los resultados del análisis de varianza correspondiente a estos datos se muestran en el anexo III.

En el tratamiento con etanol encontramos elevadas recuperaciones de celulosa (expresadas como porcentaje glucosa), en muchos de los casos próximas a la recuperación total. A 120°C, la recuperación de celulosa fue total tanto en presencia como en ausencia de catalizador, excepto en el caso de la utilización de fenol como catalizador con el que se producen ligeras pérdidas de celulosa (recuperación del $84,63 \pm 1,90\%$). Sin embargo, este tipo de pretratamiento afecta tanto a la fracción de lignina como a la de hemicelulosa. Aunque en ausencia de catalizador, a 120°C, se recupera prácticamente toda la hemicelulosa, en presencia de catalizador se producen ligeras pérdidas, aumentando éstas con la temperatura de pretratamiento. El rango de deslignificación varió entre 13,8 y 34,1; no se observaron diferencias significativas entre los distintos catalizadores utilizados ($p \leq 0,01$) ni en la recuperación de azúcares reductores ni en la de lignina para una misma temperatura.

En ausencia de catalizador, se ve un marcado efecto de la temperatura. Mientras que a 120°C la recuperación de celulosa y hemicelulosa fue total, al elevar la temperatura aumentan las pérdidas de los distintos componentes, no encontrando diferencias significativas entre el pretratamiento realizado a 160 y 175°C.

Con butanol como solvente, se observan también altas recuperaciones de celulosa, no encontrando diferencias significativas entre las distintas condiciones estudiadas. Por el contrario, en la recuperación de azúcares reductores se observa un marcado efecto de la temperatura. Con respecto a la recuperación de lignina, ésta fue menor cuando el pretratamiento se llevó a cabo en presencia de NaOH como catalizador, siendo en este caso el efecto de la temperatura muy acusado.

En general, se producen mayores deslignificaciones con butanol. Este mismo fenómeno ha sido observado por otros autores (Ghose y col., 1983) y puede ser debido a la mayor polaridad de este disolvente con respecto al etanol.

Como ya hemos comentado, este tipo de pretratamiento se aplica principalmente por su capacidad de disolver la lignina. Los datos obtenidos para el caso del *O. nervosum* muestran que, efectivamente, el pretratamiento con solventes orgánicos deslignifica, aunque este efecto no es tan grande como el producido sobre otros sustratos. En la tabla XLIII se muestran los valores en cuanto a recuperación de material inicial tras el pretratamiento, así como el porcentaje de deslignificación de diversos sustratos lignocelulósicos junto con los obtenidos en el presente trabajo para la materia prima considerada. Aunque no se pueden

CATALIZADOR	TEMPERATURA (°C)	% RECUPERACION GLUCOSA		% RECUPERACION AZUCARES REDUCTORES		RECUPERACION LIGNINA	
		Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
H ₂ O	120	99,70	(1,55) ^a	101,9	(3,73)	86,13	(5,55) ^{fg}
	160	84,85	(2,23) ^b	67,29	(3,42) ^a	73,09	(6,21) ^{acd}
	175	87,69	(1,70) ^c	66,39	(4,63) ^a	82,79	(2,53) ^{deg}
NaOH	120	99,24	(2,07) ^{ad}	81,71	(3,25) ^b	70,45	(5,58) ^{ace}
	160	89,88	(2,55) ^{bc}	68,56	(4,14) ^a	65,85	(4,44) ^{bc}
H ₂ SO ₄	120	92,88	(2,89) ^{cd}	82,33	(2,53) ^b	68,79	(4,64) ^{ab}
	160	94,80	(2,86) ^a	68,76	(3,54) ^a	79,35	(6,93) ^{adg}
Fenol	120	84,63	(2,24) ^{bc}	85,41	(3,30) ^b	72,61	(8,91) ^{abd}

TABLA XLI. Efecto del pretratamiento con etanol en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n = 4.

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05\%$)

CATALIZADOR	TEMPERATURA (°C)	% RECUPERACION GLUCOSA		% RECUPERACION AZUCARES REDUCTORES		% RECUPERACION LIGNINA	
		Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
H ₂ O	120	81,29	(2,99) ^a	82,17	(3,43) ^a	64,54	(3,55) ^a
NaOH	120	101,80	(1,57)	82,01	(3,24) ^a	66,30	(2,95) ^a
	160	83,04	(2,05) ^{ab}	58,10	(4,68) ^b	42,74	(2,91)
H ₂ SO ₄	120	93,75	(2,67) ^c	88,39	(1,41) ^{ac}	79,26	(2,40) ^b
	160	90,73	(2,73) ^{cd}	63,90	(2,79) ^b	87,51	(6,93) ^b
Fenol	120	87,32	(2,02) ^{bd}	96,41	(3,84) ^c	61,06	(5,91) ^a

TABLA XLII. Efecto del pretratamiento con butanol en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n = 4.

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05\%$)

SUSTRATO	CONDICIONES OPERATIVAS					% RECUPERA- CION MATERIAL INICIAL	% DESLIGNIFI- CACION	REFERENCIA
	Temp. (°C)	Tiempo (h)	S/L	SOLVENTE	CATALIZADOR			
Alamo Celulosa 44,8% Lignina 18,4%	165	2,5	4%	Metanol:agua70:30	ausencia	78	56,9	Chum y col, 1988
	165	1	4%	Metanol:agua70:30	H ₂ SO ₄ 0,05M	46,4	76,1	
Chopo Celulosa 52% Lignina 25%	160	0,5	10:1	Butanol:agua 1:1 (v/v)	ausencia	-	20	Holtzapple y Humphrey 1984
	160	0,5	10:1	Butanol:agua 1:1 (v/v)	H ₂ SO ₄ 1N	-	90	
	160	0,5	10:1	Butanol:agua 1:1 (v/v)	NaOH 1N	-	65	
Eucalipto Celulosa 57% Lignina 23%	165	1	4:1	Etanol:agua 1:1 (v/v)	ausencia	79,4	36,8	Colaço y Pereira, 1985
	175	0,5	4:1	Etanol:agua 1:1 (v/v)	ausencia	90,40	29,2	
Citronella Celulosa 28,5% Lignina 11,1%	175	4		Etanol:agua 1:1 (v/v)	antraquinona 0,05% p.	56,66	50	Rolz y col. 1986
Paja de trigo Celulosa 39% Lignina 14%	120	2	8%	Etanol:agua1:1 (v/v)	aromático 0,5% (v/v)	54,2	82,8	Ghose y col, 1983
	120	2	8%	Butanol:agua 1:1 (v/v)	aromático 0,5% (v/v)	51,5	75,6	
Cardo Celulosa 25% Lignina 15,7%	160	0,5	4:1	Etanol:agua 1:1 (v/v)	ausencia	54,74	19,3	Este trabajo
	160	1	4:1	Etanol:agua 1:1 (v/v)	NaOH 1N	52,41	34,4	
	160	1	4:1	Etanol:agua 1:1 (v/v)	H ₂ SO ₄ 0,1N	53,7	20,6	

TABLA XLIII. Recuperación de material inicial y deslignificación (%) para distintos sustratos lignocelulósicos.

realizar comparaciones precisas con los datos mostrados en dicha tabla, debido a las diferentes condiciones experimentales empleadas y a la naturaleza del sustrato lignocelulósico, una evaluación global sí es posible. Los porcentajes de deslignificación obtenidos en el presente trabajo son comparables a los obtenidos en algunos casos.

Rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Producción de glucosa.

En las tablas XLIV y XLV se muestran los valores del rendimiento en la hidrólisis enzimática expresados como mg de glucosa y azúcares reductores producidos por 100 mg de sustrato, porcentaje de eficiencia de sacarificación y porcentaje de conversión de celulosa en glucosa. Los análisis de varianza correspondientes a estos datos se muestran en el anexo III.

La producción de glucosa (expresada como mg/100 mg de sustrato) aumenta con este tipo de pretratamiento. En general, es mayor a medida que aumenta la temperatura de pretratamiento, exceptuando el caso del pretratamiento con etanol y catalizador básico en que el efecto de la temperatura hace disminuir dicha producción. Las condiciones óptimas se encontraron para el caso de la utilización de etanol como disolvente, a 175°C y ausencia de catalizador ($29,02 \pm 0,82$ mg /100 mg) y, en el caso de utilización de butanol a 160°C y en presencia de catalizador básico ($29,32 \pm 0,74$ mg/100 mg sustrato). En estas condiciones se incrementa en un factor de 4,2 la producción de glucosa por hidrólisis enzimática respecto al sustrato nativo.

Eficacia de sacarificación y conversión de celulosa en glucosa.

En todos los casos se obtuvo un aumento de la eficacia de sacarificación y de la conversión de celulosa en glucosa con respecto al sustrato nativo. Las condiciones en las que se obtuvieron los valores óptimos de estos dos índices coinciden con aquéllas en las que la producción de glucosa fue mayor.

En la tabla XLVI se comparan los rendimientos de hidrólisis enzimática de la biomasa de *O. nervosum* obtenida en las mejores condiciones de pretratamiento realizado en este trabajo con los citados en la bibliografía para diferentes sustratos lignocelulósicos. En ella puede observarse la fuerte dependencia del rendimiento con las distintas fuentes de material lignocelulósico y condiciones de operación.

CATALIZADOR	TEMPERATURA (°C)	mg Glucosa/100 mg sustato Gp		mg Azúcares Reductores/ 100 mg sustrato		EFICACIA DE SACARIFICACION (%)		CONVERSION CELULOSA (%)		g Glucosa/ Kg sustrato nativo
		Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	
H ₂ O	120	12,79	(5,77) ^a	15,63	(5,38) ^a	32,45	(6,17) ^a	33,51	(5,77) ^a	93,29
	160	22,07	(1,78) ^b	22,31	(5,36)	57,36	(2,97) ^b	48,73	(2,96) ^b	120,81
	175	29,02	(2,81) ^c	32,32	(1,83) ^b	63,04	(3,68) ^{bc}	55,27	(2,31) ^c	137,06
NaOH	120	28,74	(2,62) ^c	44,40	(1,09)	66,27	(2,76) ^c	65,76	(1,19)	163,09
	160	21,39	(5,89) ^b	33,27	(2,24) ^b	50,16	(5,54)	45,12	(7,01) ^b	112,10
H ₂ SO ₄	120	11,71	(4,81) ^a	18,20	(6,74) ^c	35,77	(4,96) ^{ad}	33,24	(6,30) ^a	82,35
	160	25,30	(2,87)	29,87	(2,07) ^b	57,78	(2,92) ^b	54,80	(3,60) ^c	135,86
Fenol	120	13,49	(2,59) ^a	16,27	(4,50) ^a	40,27	(4,10) ^d	34,06	(2,59) ^a	94,82

TABLA XLIV. Efecto del pretratamiento con etanol en el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = Valor medio.

Cv = Coeficiente de variación (%)

n = 4

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

CATALIZADOR	TEMPERATURA (°C)	mg Glucosa/100 mg sustato Gp		mg Azúcares Reductores/ 100 mg sustrato		EFICACIA DE SACARIFICACION (%)		CONVERSION CELULOSA (%)		g Glucosa/ Kg sustrato nativo
		Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	
H ₂ O	120	13,67	(5,77) ^a	17,02	(1,32) ^a	41,83	(5,17)	34,01	(5,77) ^a	94,73
NaOH	120	24,88	(3,38) ^b	36,59	(4,30)	57,40	(2,87) ^a	58,47	(4,06)	144,95
	160	29,32	(2,52)	41,21	(1,21)	60,11	(1,09) ^a	49,93	(1,03) ^b	122,90
H ₂ SO ₄	120	10,71	(4,31)	17,55	(5,09) ^a	33,99	(5,19) ^b	31,88	(5,69) ^a	79,02
	160	24,08	(2,90) ^b	25,98	(1,29)	56,72	(4,28) ^a	51,49	(5,44) ^b	127,60
Fenol	120	12,67	(4,59) ^a	15,84	(1,31) ^a	36,13	(3,16) ^b	31,56	(4,59) ^a	87,85

TABLA XLV. Efecto del pretratamiento con butanol en el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = Valor medio.

Cv = Coeficiente de variación (%)

n = 4

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

SUSTRATO	CONDICIONES OPERATIVAS					ES (%) Sustrato nativo	ES (%) Sustrato pretratado	REFERENCIA
	Temp. (°C)	Tiempo (h)	S/L	SOLVENTE	CATALIZADOR			
Citronella Celulosa 28,5% Lignina 11,1%	175	4		Etanol:agua 60:40	Antraquinona 0,05% p.	14	60	Rolz y col., 1986
Paja de trigo	120	2	8%	Etanol:agua 1:1 (v/v)	Aromático 0,5 % (v/v)	20	90	Ghose y col., 1983
Celulosa 39% Lignina 14%	120	2	8%	Butanol:agua 1:1 (v/v)	Aromático 0,5 % (v/v)	20	80	
Eucalipto Celulosa 57% Lignina 23%	175	0,5	4:1	Etanol:agua 1:1 (v/v)	Ausencia	10	77	Colaço y Pereira, 1985
Cardo	120	1	4:1	Etanol:agua 1:1 (v/v)	NaOH 1 N	25	66,3	Este trabajo
Celulosa 25% Lignina 15,7%	120	1	4:1	Butanol:agua 1:1 (v/v)	NaOH 1 N	25	60,1	

TABLA XLVI. Rendimientos de hidrólisis de diversos pretratamientos con solventes orgánicos de diferentes sustratos lignocelulósicos.

4.2.2.6.2. Pretratamiento con n-butilamina.

Dentro de los pretratamientos con solventes orgánicos, se ha estudiado, asimismo, el pretratamiento con n-butilamina. La utilización de este tipo de solvente ha sido descrita como muy efectiva para algunos sustratos lignocelulósicos. Así por ejemplo, Tanaka y col. (1985a) que aplicaron este tratamiento a la paja de trigo (1% de n-butilamina a 120°C) obtuvieron pérdidas de peso del material inicial de alrededor del 30%, una deslignificación del 60%, y un aumento de la solubilización enzimática (en 48 horas de hidrólisis enzimática) de 10% en el caso del sustrato nativo y de hasta el 78% en el sustrato pretratado.

Aunque, como ya se ha comentado en anteriores ocasiones, la utilización de pretratamientos químicos presenta algunos inconvenientes, el tratamiento con n-butilamina, y dado que este compuesto presenta un bajo punto de ebullición (77°C), implicaría la ventaja de la posibilidad de recuperación de este tipo de reactivo por destilación y su reutilización posterior, con la consiguiente disminución de los costes de este tratamiento. El principal efecto de este tipo de pretratamiento químico es la deslignificación del material lignocelulósico y según algunos autores se produce, además, un "swelling" de la celulosa, que afecta únicamente a la región amorfa, a la hemicelulosa y lignina.

El pretratamiento del *O.nervosum* con n-butilamina se llevó a cabo utilizando las condiciones descritas como óptimas en la bibliografía para la deslignificación de paja de arroz (Tanaka y col., 1985b).

En la tabla XLVII se recogen los resultados obtenidos en cuanto a recuperación del material inicial (expresado en porcentaje sobre peso seco) y la composición de los residuos sólidos obtenidos después del pretratamiento, en celulosa, hemicelulosa y lignina.

En la tabla XLVIII se recogen los valores de recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina en los residuos sólidos obtenidos tras el pretratamiento.

Aunque sólo se han estudiado dos condiciones de pretratamiento, se observa una elevada recuperación del material inicial (alrededor del 80%), produciéndose además una alta recuperación de celulosa (expresada como glucosa) y de la fracción de lignina, y unas ligeras pérdidas de hemicelulosa (pérdida máxima obtenida expresada como azúcares reductores alrededor del 15%).

CONDICIONES			% RECUPERACION MATERIAL INICIAL (r)* Vm Cv	COMPOSICION (%)					
Relación S:L	Tempera- tura (°C)	Tiempo (horas)		% GLUCOSA Vm Cv		% AZUCARES REDUCTORES Vm Cv		% LIGNINA Vm Cv	
10	120	2	81,20 (1,39)	30,10	(1,85)	45,02	(2,60)	20,79	(3,66)
25	120	2	80,90 (2,27)	30,70	(2,38)	48,03	(3,34)	18,96	(7,09)

TABLA XLVII. Porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) después del pretratamiento (r) y composición de los residuos sólidos para las distintas condiciones de pretratamiento con 1% n-butilamina.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación

n = 4

n* = 2

CONDICIONES			(%) RECUPERACION GLUCOSA	(%) RECUPERACION AZUCARES REDUCTORES	(%) RECUPERACION LIGNINA
Relación S:L	Tempera- tura (°C)	Tiempo (horas)	Vm Cv	Vm Cv	Vm Cv
10	120	2	98,95 (0,90)	86,23 (1,68)	100,30 (4,00)
25	120	2	100,55 (2,30)	91,63 (2,99)	97,58 (8,92)

TABLA XLVIII. Efecto del pretratamiento con 1% n-butilamina en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina.
Vm = valor medio
Cv = coeficiente de variación (%)
n = 4

En la tabla XLIX se recogen los valores de rendimiento en la hidrólisis enzimática. A pesar de la baja o nula deslignificación obtenida en los dos casos estudiados, se produce, como consecuencia del pretratamiento, un aumento considerable de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática. Ésta (expresada como mg glucosa/ 100 mg sustrato) aumentó de 6,2 en el sustrato nativo hasta 19,6 en las mejores condiciones, lo que indica que más importante que la deslignificación del material, es la modificación de las relaciones entre los distintos componentes de la fibra y por lo tanto, de su estructura. La eficacia de sacarificación alcanzó valores del 63,7% para el tratamiento efectuado con una relación sólido/líquido del 25%, y del 43,47% para el 10% de relación sólido-líquido. Estos valores suponen un incremento del 255 % y del 174% respectivamente con respecto al sustrato nativo. En este último caso la eficacia de sacarificación obtenida fue del 66,3%, la pérdida de celulosa nula, mientras que la deslignificación fue del 18%.

Para las mismas condiciones de pretratamiento, con un sustrato similar al *O.nervosum*, *Cynara cardunculus* (datos no publicados) se obtuvieron en nuestro laboratorio valores de eficacia de sacarificación del 20% y 48% (para las condiciones de relación sólido-líquido del 10% y 25% respectivamente). En este último caso el incremento del rendimiento de hidrólisis con respecto al sustrato nativo (eficacia de sacarificación del 20%) fue similar al producido sobre la biomasa del *O.nervosum*.

CONDICIONES			mg Glucosa/100 mg sustrato Gp	mg Azúcares Reductores/100 mg sustrato	EFICACIA DE SACARIFICACION (%)	CONVERSION CELULOSA (%)	g Glucosa/Kg sustrato nativo
Relación S:L	Tempera- tura (°C)	Tiempo (horas)	Vm Cv	Vm Cv	Vm Cv	Vm Cv	
10	120	2	13,06 (6,28)	16,51 (5,58)	43,37 (5,07)	42,75 (5,07)	
25	120	2	19,57 (4,56)	22,00 (4,45)	63,73 (3,55)	63,82 (2,83)	158,2

TABLA XLIX. Efecto del pretratamiento con 1% n-butilamina en el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n = 4

4.2.2.7. Pretratamiento de explosión por vapor.

El pretratamiento de explosión por vapor, patentado en 1926 por Manson para la producción de tableros de madera, combina el efecto autohidrolítico con una desorganización mecánica de la fibra lignocelulósica por efecto de la descompresión brusca a que es sometido el material. El proceso se lleva a cabo inyectando vapor a presión en un recipiente donde se introduce el sustrato a tratar. El vapor penetra en la estructura lignocelulósica del material que, después de un tiempo de reacción determinado, es expulsado hacia un ciclón a presión atmosférica.

Existen distintos procesos desarrollados tanto a escala piloto como a escala de producción. Los diferentes procesos difieren en los sistemas de alimentación, modo de operación (continuo o discontinuo) y condiciones de operación (temperatura y tiempo de residencia).

La planta piloto en la que se han llevado a cabo las pruebas de explosión por vapor se muestra en la figura 38. En el esquema de la figura 15 se muestra el diagrama de operación de la planta piloto de tratamiento. La unidad de explosión de vapor está constituida por 3 unidades: reactor de explosión por vapor, acumulador de vapor y ciclón de descarga, cuyas características se describen en el anexo II.

El efecto de este pretratamiento es la liberación de ácidos orgánicos, fundamentalmente ácido acético a partir de los restos acetilados de las hemicelulosas. Como consecuencia, se produce una autohidrólisis ácida que afecta a los enlaces glicosídicos de las hemicelulosas y a los enlaces α -éter de la lignina, en mayor o menor medida dependiendo de la severidad de las condiciones empleadas (Puls y col., 1983). Cuando las condiciones son muy severas las pentosas se transforman en furfural y las hexosas en 5-hidroximetilfurfural, los cuales pueden generar productos de condensación (Puls y col., 1985). Aunque, la prehidrólisis de las hemicelulosas es la reacción principal, también se producen cambios en la lignina, que se hace fácilmente extraíble en medio alcalino o con solventes orgánicos.

El resultado final de este tipo de pretratamiento es la alteración del empaquetamiento microfibrilar dentro de la pared celular y la rotura de la fibra que provoca un aumento de la accesibilidad a la celulosa de las enzimas hidrolíticas. Este efecto de incremento de la eficacia de hidrólisis enzimática se produce tanto para el caso de biomasa procedente de maderas duras como para el caso de biomasa de residuos agrícolas. Las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de reacción varían dependiendo del tipo de material.



Figura 38. Planta piloto de tratamiento de material lignocelulósico

Así, por ejemplo, los resultados de los informes publicados por Iotech Corporation sobre explosión por vapor de biomasa procedente de maderas duras, indican encuentra que las condiciones óptimas tanto para la recuperación de xilosa como de glucosa son de 500-550 psig, con un tiempo de reacción de 40-50 s y un contenido inicial de humedad en la biomasa del 35%. En estas condiciones, se obtuvo una producción máxima de glucosa equivalente al 90% del contenido teórico para los distintos sustratos ensayados, después de 24 horas de hidrólisis, utilizando una combinación de enzimas, Novo Celluclast 100L (procedente de *T. reesei*) y 250L (enzima procedente de *A.niger*), con una actividad enzimática de 9UIPF/g y una concentración de sustrato del 5% en el medio de hidrólisis.

Jurasek (1979), utilizando este tipo de pretratamiento sobre madera de álamo y estudiando un rango de condiciones entre 600 y 700 psig y tiempos de residencia de 20 a 80 s encontró que en las condiciones óptimas (240°C) se obtenía una producción de glucosa del 40 % cuando la hidrólisis se llevaba a cabo a 30°C durante 24 horas con Maxazyme CL 2000 (enzima procedente de *T. reesei*) con una concentración de 30 UI/g sustrato. La producción de glucosa en el sustrato nativo fue del 5%.

Dekker y Wallis (1983) obtuvieron una conversión de glucosa del 50% cuando se hidrolizaba bagazo de caña de azúcar (condiciones óptimas de pretratamiento 225 psig, durante 1-20 min.) utilizando enzimas procedentes de *T.reesei* RutC30 y QM9414, en una concentración de 20 UI/g sustrato. La hidrólisis fue llevada a cabo a 50°C durante 24 horas, una relación sólido:líquido del 10% (p/v). La conversión aumentaba hasta el 80% cuando se añadía celobiosa procedente de *A. niger*.

Puri y Mamers (1983) trabajaron con tres sustratos distintos: paja de trigo, bagazo y madera de eucalipto. Las condiciones óptimas de pretratamiento de explosión por vapor fueron a 200°C y 5 minutos para el primero de ellos y 210°C y 10 minutos para los otros dos. Las conversiones obtenidas para estas condiciones fueron del 81,78 y 75% respectivamente. En este caso la hidrólisis fue llevada a cabo con celulasas comerciales Onozuca (procedente de *T.reseei*). Los mismos autores también estudiaron el efecto de la inyección de CO₂ durante el pretratamiento, encontrando un aumento de la autohidrólisis, probablemente, debido a la formación de ácido carbónico a altas temperaturas por reacción del CO₂ con el vapor condensado.

Rao y col. (1983) obtuvieron después del pretratamiento (7Kg/cm² y 30 minutos) de bagazo, un 59% de conversión de glucosa después de 48 horas de hidrólisis utilizando celulasas procedentes de *Penicillium funiculosum*. La hidrólisis fue llevada a cabo utilizando una relación sólido:líquido del 2.5% y una carga de enzima de 50 UI/g sustrato.

Grous y col. (1986) obtuvieron conversiones superiores al 90 % sobre madera de álamo tratado por explosión de vapor en las siguientes condiciones, 250 psig durante 20 min, 350 psig durante 5 min y 20 min y 450 psig durante 2, 5 y 20 min, realizando la

hidrólisis enzimática con enzimas procedentes de *T.reesei* (16,2 UI/g) y *A.niger* (76 UI/g) durante 24 horas a 50°C. En el caso del sustrato nativo la conversión obtenida fue del 15,2%.

McDonald y col. (1979) utilizando enzimas comerciales Onozuca R10 y Onozuca SS (enzimas procedentes de *T.reesei*), llevaron a cabo la hidrólisis enzimática sobre madera de álamo durante 24 horas, con una relación sólido:líquido del 2% y una concentración de enzima de 0,25 g de enzima/g de sustrato. La conversión obtenida (porcentaje de glucosa producida) fue del 39% cuando el sustrato se trató en las condiciones óptimas (7,5 min, 190°C). En este caso, las bajas conversiones obtenidas pueden ser debidas a que la hidrólisis se realizó a 22°C.

De los estudios anteriores, se puede deducir, que existe un rango considerable de condiciones óptimas de pretratamiento (temperatura, tiempo), dependiendo del tipo de material y deben ser determinadas para cada material con el fin de obtener una elevada recuperación de carbohidratos y una degradación óptima de la fibra.

Recuperación de material inicial.

Para el caso del *Onopordum nervosum* y como puede observarse en la tabla L, en las condiciones ensayadas se llegan a alcanzar recuperaciones del material por encima del 88%. Sin embargo, por razones de diseño de la planta, el material que se obtiene después del pretratamiento va acompañado de un volumen considerable de líquido procedente de la condensación de vapor (en una proporción que oscila entre 2 y 4 litros de agua por cada 200 g de material tratado). Por este motivo, se ha considerado como recuperación efectiva de sólidos el peso seco del material obtenido después de la filtración del lodo resultante, que como puede observarse en dicha tabla es para el caso más favorable del 77,05%. En la misma tabla se recogen los valores de la composición de los residuos obtenidos para distintas condiciones de tratamiento de explosión por vapor. Se observa que las pérdidas de peso ocasionadas por efecto del pretratamiento son mayores para las condiciones más drásticas (temperaturas más elevadas y tiempos de residencia largos). Además, la mayor parte de la pérdida total de peso se produce durante los primeros segundos de pretratamiento.

Recuperación de celulosa y lignina.

En la tabla LI se muestran los valores de recuperación de celulosa, azúcares reductores y lignina expresados en porcentaje para las distintas condiciones de tratamiento de explosión por vapor ensayadas. El análisis de la varianza según diseño factorial 2x5 y 3x4 se muestran en el anexo III.

Es de destacar las elevadas pérdidas de azúcares reductores, siendo mucho menores las pérdidas correspondientes a la glucosa, lo que muestra una solubilización preferente de las hemicelulosas del sustrato. Las dos variables estudiadas: temperatura y tiempo de residencia influyen en la recuperación de glucosa, de forma que, a medida que aumenta la

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	% RECUPERACION MATERIAL INICIAL (r)		% GLUCOSA		% AZUCARES REDUCTORES		% LIGNINA	
		Solidos totales	Solidos después de filtrar	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
190	0,5	84	60,48	39,65	(1,53)	54,02	(2,89)	21,21	(7,00)
	1	88	77,05	29,58	(2,10)	46,43	(1,97)	29,53	(1,41)
	2	78	63,32	36,71	(1,39)	49,70	(3,27)	28,54	(4,85)
	4	85	62,24	34,36	(1,51)	50,48	(3,48)	26,68	(2,69)
210	0,5	85	67,48	35,75	(1,96)	51,74	(2,51)	22,60	(3,17)
	1	84	63,07	38,01	(7,96)	44,17	(4,68)	29,38	(5,27)
	2	82	60,65	39,88	(2,02)	44,51	(3,11)	34,46	(2,96)
	4	83	61,59	36,29	(11,0)	45,68	(3,49)	33,91	(5,63)
	8	82	57,87	42,77	(3,64)	49,87	(3,44)	32,95	(4,87)
230	0,5	82	63,19	37,41	(1,88)	44,89	(1,68)	31,15	(7,75)
	1	79	60,16	34,74	(0,92)	41,12	(2,56)	39,46	(2,35)
	2	77	59,16	34,43	(1,13)	43,09	(5,87)	38,80	(3,40)
	4	78	57,31	39,79	(3,86)	43,71	(2,58)	37,94	(5,51)
	8	78	55,99	40,13	(2,20)	48,01	(2,61)	30,88	(2,65)

TABLA L. Porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) después del pretratamiento (r) y composición de los residuos sólidos para las distintas condiciones de pretratamiento de explosión por vapor.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación.

n = 4

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	% Recuperación Glucosa		% Recuperación Azúcares Reductores		% Recuperación Lignina	
		Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
190	0,5	79,84	(1,53)	64,95	(2,89)	61,07	(7,00)
	1	75,88	(2,10)	71,13	(1,97)	108,35	(1,41)
	2	77,37	(1,39)	62,57	(3,27)	86,06	(4,85)
	4	71,19	(1,51)	62,46	(3,48)	79,06	(2,69)
210	0,5	80,31	(1,96)	69,41	(2,51)	72,62	(3,17)
	1	79,63	(4,58)	55,44	(7,99)	38,12	(2,12)
	2	80,53	(3,71)	53,67	(4,04)	99,47	(1,24)
	4	74,21	(7,96)	55,96	(6,01)	99,57	(8,73)
	8	82,38	(3,44)	57,37	(3,44)	90,80	(4,87)
230	0,5	78,69	(1,88)	56,39	(1,68)	93,73	(7,75)
	1	69,57	(2,28)	49,20	(4,62)	113,0	(1,86)
	2	68,32	(1,69)	51,02	(4,16)	108,8	(5,74)
	4	75,81	(2,49)	49,75	(2,73)	103,3	(0,67)
	8	74,79	(2,20)	53,44	(2,61)	82,33	(2,65)

TABLA LI. Efecto del pretratamiento de explosión por vapor en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%).

n = 4

temperatura, la recuperación es menor. Cuando se considera el factor tiempo, se observa que la recuperación disminuye con el tiempo, pero a partir de 1 minuto y dentro del rango estudiado, la recuperación es de orden similar. Con respecto a la recuperación de azúcares reductores, se observa que es en la fracción de hemicelulosa donde se producen mayores solubilizaciones. La solubilización se produce fundamentalmente durante el primer minuto, siendo constantes estas pérdidas a partir de los minutos siguientes.

Por otra parte, la fracción en la que se producen menores solubilizaciones es la de lignina. Los resultados obtenidos muestran que, en general, la recuperación de lignina aumenta al aumentar la temperatura del pretratamiento, alcanzando valores por encima del 100% cuando el pretratamiento se realizó a 230°C durante 1-4 min. Los valores que aquí se muestran corresponden a lignina Klason (lignina ácido insoluble) encontrándose en algunos casos valores superiores al contenido de lignina Klason real. Este hecho, puede ser debido a la formación de complejos de condensación de lignina y polisacáridos, que se cuantificarían como lignina ácido insoluble puesto que el contenido en este componente ha sido calculado por el método de hidrólisis total con ácido sulfúrico. Este fenómeno ha sido observado por numerosos autores (Brownell y Saddler, 1984; Brownell y col., 1984 y 1986).

Rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Producción de glucosa.

En la tabla LII se muestran los datos referentes a la producción de glucosa y azúcares reductores (expresados en porcentaje) después de 48 horas de hidrólisis enzimática a 50°C. En el anexo III se muestran los análisis correspondientes a estos datos según diseño factorial 2x5 y 3x4.

Para todos los rangos de temperatura y tiempo de residencia se alcanzan valores muy por encima de los obtenidos. Si tenemos en cuenta que con el control (cardo sin pretratar), los valores encontrados son del orden del 7,5%, se observa que el incremento obtenido oscila entre 2 y 4,8 veces.

En general, la producción de glucosa y azúcares reductores aumenta a medida que aumenta la temperatura y para cada una de ellas con el tiempo de residencia del material. Los valores más altos se obtuvieron para el pretratamiento a 230°C durante 4 minutos ($36,13 \pm 1,22$ mg glucosa/100 mg sustrato).

Eficacia de sacarificación y conversiones de celulosa en glucosa.

Los estudios de hidrólisis enzimática recogidos en la tabla LII, muestran claramente el efecto del tratamiento de explosión por vapor en la eficiencia con que las enzimas actúan sobre la celulosa del cardo. Así por ejemplo, mientras que los valores de eficacia de sacarificación (relación entre la glucosa liberada y glucosa potencialmente liberable en un sustrato) están alrededor del 25% para el caso del material sin tratar, en el caso del tratamiento a

Tempera- tura (°C)	Tiempo (min)	mg Glucosa/ 100 mg sustrato Gp		mg Azúcares Reductores/ 100 mg sustrato		ES (%)		CC (%)		g Glucosa/ Kg sustrato nativo
		Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	
190	0,5	22,83	(6,99)	30,34	(2,93)	57,57	(6,98)	45,62	(6,88)	138,1
	1	15,79	(5,62)	21,32	(5,78)	53,37	(5,62)	40,95	(6,07)	121,6
	2	23,04	(4,45)	30,67	(2,37)	62,76	(4,45)	47,66	(1,24)	145,9
	4	25,86	(2,44)	33,94	(1,92)	75,27	(2,43)	53,82	(2,29)	161,0
210	0,5	20,90	(4,62)	28,61	(3,92)	58,47	(4,62)	47,89	(4,36)	141,1
	1	29,41	(6,39)	236,56	(8,24)	77,47	(2,20)	61,82	(3,57)	185,2
	2	28,86	(2,72)	36,55	(8,92)	72,38	(1,93)	58,08	(3,97)	175,1
	4	32,24	(2,61)	38,14	(5,75)	89,45	(8,59)	65,95	(1,27)	198,4
	8	35,80	(1,71)	44,63	(2,42)	83,71	(1,71)	69,32	(0,95)	207,1
230	0,5	30,57	(3,87)	37,99	(4,48)	81,70	(3,86)	64,66	(3,12)	193,1
	1	33,93	(1,39)	36,90	(5,11)	97,68	(1,39)	67,47	(2,09)	204,1
	2	33,67	(1,28)	39,29	(8,68)	97,77	(1,26)	67,28	(3,12)	200,7
	4	36,13	(3,39)	41,81	(14,00)	90,81	(1,19)	68,84	(2,28)	206,8
	8	32,19	(1,76)	42,35	(2,24)	80,22	(1,76)	60,00	(1,76)	180,2

TABLA LII. Efecto del pretratamiento de explosión por vapor en el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n = 4

230°C durante 1 y 2 min, la eficacia de sacarificación es superior al 97%. De los estudios estadísticos realizados (anexo III), se deduce que tanto la temperatura como el tiempo de reacción, tienen un efecto positivo sobre la eficacia de sacarificación, siendo el efecto producido por la primera de ellas mucho más marcado que el debido al tiempo de reacción. En cuanto a la conversión de celulosa, se observa el mismo patrón de comportamiento que en el caso de la eficacia de sacarificación, aunque las diferencias encontradas se acortan al quedar compensado el incremento del rendimiento de hidrólisis con las pérdidas de celulosa. Esto último indica que a pesar de la alta pérdida de celulosa, para este pretratamiento (alrededor del 21%) la celulosa remanente está suficientemente alterada como para que el rendimiento de hidrólisis compense dichas pérdidas. Los valores más altos de conversión de celulosa se han encontrado para las condiciones de pretratamiento a 210°C durante 8 minutos y 230°C durante 4 minutos (69,32% y 68,84% respectivamente).

Aunque desde el punto de vista de economía global del proceso hay que buscar condiciones en las que la degradación de la celulosa sea mínima, uno de los objetivos fundamentales del pretratamiento debe ser aumentar al máximo la eficiencia de sacarificación de la celulosa ya que ésto conduciría a la obtención de jugos azucarados de mayor concentración en azúcares y más adecuados para ser sometidos a fermentaciones posteriores.

La principal ventaja del pretratamiento de explosión por vapor es la posibilidad de minimizar la descomposición de azúcares durante el mismo acotando estrictamente las condiciones de pretratamiento así como, la obtención de altas concentraciones de azúcares utilizando moderadas concentraciones de enzima.

Asimismo, la presencia de lignina, cuyas pérdidas son escasas o nulas durante el tratamiento de *O.nervosum* en las distintas condiciones ensayadas, no parece, a la vista de los resultados constituir en el material pretratado una barrera para el acceso de las enzimas a la fracción celulósica.

También es interesante resaltar que las conversiones de celulosa son relativamente altas incluso cuando se realizó la hidrólisis enzimática después de haber secado el residuo obtenido tras el pretratamiento. Sin embargo, otros autores (Grous y col., 1986) han observado que la producción de glucosa cuando la biomasa se seca previamente a la hidrólisis es mucho menor que cuando la biomasa permanece húmeda. La explicación de este fenómeno según estos autores es que, posiblemente, se pueda producir un colapso en la estructura porosa creada durante el pretratamiento. En cualquier caso, para el trabajo aquí recogido se ha optado por el secado previo del residuo con el fin de poder realizar una mejor comparación con los otros tipos de pretratamientos.

4.2.2.7.1. Pretratamiento de explosión por vapor en medio ácido.

De acuerdo con los resultados obtenidos por algunos autores, la aplicación del tratamiento de explosión con vapor en condiciones ácidas mejora la solubilización de la hemicelulosa, reduciendo la temperatura y tiempo óptimos de reacción y disminuyendo consecuentemente la de gradación de las pentosas. Así, por ejemplo, según Morjanoff y Gray (1987) el tiempo óptimo de pretratamiento sobre bagazo de caña a 220°C disminuye de 3 minutos a 30 segundos cuando éste se realiza en condiciones ácidas (1% H₂SO₄). La producción de glucosa por hidrólisis enzimática del mismo aumentaba desde 48 g/100 g bagazo, cuando el tratamiento se realizaba en ausencia de ácido sulfúrico, hasta 57,7 g/100 g sustrato cuando se realizaba en presencia de ácido.

Pourquie y Vandecasteele (1990) obtienen un incremento del rendimiento de la hidrólisis enzimática de paja de trigo desde 5,8%, en el caso del sustrato nativo, a 31,3% en el caso del sustrato sometido a pretratamiento de explosión de vapor (21 atm., 3 min.) y 62% en el caso de realizar este último pretratamiento en condiciones ácidas (H₂SO₄ 0,08N; 18 atm., 12 min.). Los mismos autores observaron este mismo efecto de incremento del rendimiento de la hidrólisis no sólo para la paja de trigo sino también para biomásas procedentes de distintas especies (residuos agrícolas y forestales) aunque en el caso concreto de biomasa procedente de maderas blandas éstas fueron menos susceptibles a este tipo de pretratamiento.

Los resultados obtenidos por Aguilera y San Martín (1985) muestran que la digestibilidad enzimática de la biomasa procedente de pino (madera blanda) aumenta entre 4 y 6 veces con respecto al sustrato nativo, cuando se realiza el pretratamiento de explosión por vapor en ausencia de ácido, y alrededor de 10 veces cuando el sustrato se impregna previamente con ácido sulfúrico.

A la vista de lo expuesto, se ha estudiado este tipo de pretratamiento para la biomasa del cardo *O. nervosum* realizando la impregnación del material con ácido sulfúrico al 0,4% y 1%.

Recuperación del material inicial.

En la tabla LIII se recogen los resultados obtenidos de recuperación de material inicial (expresado como porcentaje en peso seco) así como los valores de composición en glucosa, azúcares reductores y lignina de los residuos sólidos obtenidos después del pretratamiento.

CONDICIONES			% RECUPERACION MATERIAL INICIAL (r)	COMPOSICION (%)					
Concen- tración ácido (%)	Tempera- tura (°C)	Tiempo (min)		% GLUCOSA		% AZUCARES REDUCTORES		% LIGNINA	
				Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
0,4	170	2	78,99	36,87	(3,51)	54,67	(1,89)	27,39	(4,33)
	170	4	69,86	41,10	(5,93)	56,33	(1,93)	27,78	(1,99)
	170	8	69,70	38,82	(3,52)	57,74	(4,46)	27,75	(2,70)
	190	2	70,77	36,88	(1,93)	56,68	(2,65)	30,03	(1,89)
	190	4	68,77	38,34	(3,39)	51,21	(7,00)	31,00	(4,98)
	210	2	70,20	40,28	(2,77)	55,15	(5,28)	29,63	(4,06)
1	170	2	65,04	42,08	(1,74)	58,71	(3,41)	31,77	(9,63)
	170	4	62,27	41,88	(0,63)	54,49	(5,32)	31,64	(6,70)
	170	8	64,37	36,08	(4,17)	59,68	(1,99)	30,82	(5,51)
	190	2	64,77	39,90	(1,78)	52,68	(1,73)	28,84	(3,06)
	190	4	65,53	38,59	(4,82)	53,08	(3,41)	28,48	(1,02)

TABLA LIII. Porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) después del pretratamiento (r) y composición de los residuos sólidos para las distintas condiciones de pretratamiento con explosión de vapor en medio ácido.

Vm = valor medio. Cv = coeficiente de variación. n = 4

En el rango de condiciones estudiadas la máxima recuperación se obtuvo cuando el pretratamiento se realizó a 170°C durante 2 min. e impregnando el material con H₂SO₄ al 0,4%. Además, tal y como cabría esperar, la recuperaciones fueron menores que en el caso del pretratamiento de explosión de vapor en ausencia de ácido si se comparan los valores obtenidos para una condición dada.

Recuperación de celulosa y lignina.

En la tabla LIV se recogen los valores de recuperación de celulosa (expresado como glucosa), azúcares reductores y lignina, expresados en porcentaje para cada una de las condiciones de pretratamiento realizadas. El análisis de la varianza se muestra en el anexo III.

Con este tipo de pretratamiento, se producen, al igual que en el caso de ausencia de ácido, altas pérdidas de azúcares reductores, siendo éstas menores para el caso concreto de la glucosa. Con respecto a esta última fracción es de destacar que la variable tiempo, al menos en el rango estudiado, no parece que tenga una influencia significativa, mientras que en el caso de los azúcares reductores totales sí la tiene. En ambos casos, el aumento de temperatura y concentración de ácido utilizado en la impregnación no producen disminuciones significativas de la recuperación. La fracción de lignina, sin embargo, tiene un patrón de solubilización diferente; solamente el aumento de la concentración de ácido sulfúrico hace disminuir la recuperación de lignina, mientras que ni la temperatura ni el tiempo de pretratamiento parece que ejerzan una gran influencia (no se han encontrado diferencias significativas $p \leq 0.01$). Otro punto interesante es la pequeña deslignificación que se produce con este tipo de pretratamiento, ésta fue menor del 10% en todos los casos estudiados.

Rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Producción de glucosa.

En la tabla LV se muestran los valores de producción de glucosa y azúcares reductores (expresados como porcentaje) después de 48 horas de hidrólisis enzimática. En el anexo III se muestran los análisis de varianza correspondientes a estos datos.

Con este tipo de pretratamiento se obtuvo en todos los casos un incremento con respecto al sustrato nativo en la producción de glucosa que varió desde 1,7 en las condiciones menos favorables hasta 2,9 en aquellas más favorables.

Eficacia de sacarificación y conversión de celulosa en glucosa.

Aunque con la impregnación ácida cabría esperar que se incrementase el efecto de la explosión por vapor en la hidrólisis enzimática, los resultados muestran (como se observa en la tabla LV) que se produce una considerable disminución en la eficacia de sacarificación y en la conversión de celulosa con respecto al sustrato no impregnado. Puesto que el trata-

CONDICIONES			Recuperación Glucosa (%)		Recuperación Azúcares Reductores (%)		% Recuperación Lignina (%)	
Concen- tración ácido (%)	Tempera- tura (°C)	Tiempo (min)	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
0,4	170	2	96,95	(3,51) ^a	85,85	(1,89) ^a	103,0	(4,33) ^a
	170	4	95,56	(5,66) ^a	77,97	(2,14) ^{ab}	92,10	(2,36) ^a
	170	8	90,06	(3,41) ^a	79,93	(4,55) ^{ac}	92,01	(2,71) ^a
	190	2	86,88	(1,93) ^a	79,74	(2,65) ^{ad}	101,2	(1,89) ^a
	190	4	87,84	(6,88) ^a	71,02	(5,53) ^{be}	103,1	(6,23) ^a
	210	2	94,12	(2,77) ^a	76,97	(5,28) ^{bc,d}	99,04	(4,06) ^a
1	170	2	91,10	(2,23) ^a	75,48	(3,17) ^{bcd,f}	97,80	(9,23) ^a
	170	4	86,81	(0,80) ^a	67,53	(5,37) ^{ef,g}	93,93	(6,83) ^a
	170	8	77,30	(4,13) ^b	76,09	(1,71) ^{bcd,g}	94,12	(5,78) ^a
	190	2	86,03	(1,90) ^a	67,87	(1,76) ^{ef,g}	88,99	(3,12) ^a
	190	4	84,27	(7,75) ^b	70,12	(2,02) ^{eg}	90,14	(1,20) ^a

TABLA LIV. Efecto del pretratamiento con explosión de vapor en medio ácido en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina.

Vm = valor medio. Cv = coeficiente de variación (%). n = 4.

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

CONDICIONES			RENDIMIENTO HIDROLISIS ENZIMATICA					
Concen- tración ácido (%)	Tempera- tura (°C)	Tiempo (min)	mg Glucosa/100 mg sustrato Gp Vm Cv	mg Azúcares Reductores/100 mg sustrato Vm Cv	ES (%) Vm Cv	CC (%) Vm Cv	g Glucosa/Kg sustrato nativo	
0,4	170	2	13,05 (2,88) ^a	15,39 (1,95) ^a	35,60 (2,99) ^a	34,32 (2,88) ^a	103,08	
	170	4	15,29 (4,12) ^{ab}	17,48 (5,07) ^{ab}	36,80 (5,86) ^a	35,55 (4,16) ^a	106,81	
	170	8	19,28 (4,28) ^c	23,84 (4,32) ^c	49,29 (3,73) ^b	44,72 (4,03) ^b	134,38	
	190	2	18,47 (3,55) ^{cd}	22,83 (2,81) ^{cd}	50,45 (2,79) ^b	43,51 (3,55) ^{bc}	130,71	
	190	4	18,97 (4,55) ^c	18,57 (4,71) ^{bc}	49,54 (6,11) ^b	43,42 (5,22) ^{bd}	130,46	
	210	2	20,54 (6,17) ^c	20,97 (2,63) ^{de}	50,70 (7,23) ^b	48,01 (6,17) ^{be}	144,19	
1	170	2	22,09 (3,42)	18,70 (4,62) ^{de}	52,53 (8,34) ^b	47,36 (9,69) ^b	143,67	
	170	4	17,97 (3,26) ^{bc}	21,71 (2,40) ^{dec}	42,86 (3,30) ^a	37,26 (3,06) ^{aacd}	111,90	
	170	8	18,46 (1,04) ^{ce}	20,67 (5,47) ^e	51,00 (1,21) ^b	39,55 (1,71) ^{ad}	118,83	
	190	2	15,98 (5,05) ^{bde}	12,42 (3,50) ^a	39,77 (6,28) ^a	34,45 (4,94) ^a	103,50	
	190	4	15,78 (3,37) ^{abde}	16,98 (5,85) ^a	40,22 (2,93) ^a	34,44 (6,58) ^a	103,41	

TABLA LV. Efecto del pretratamiento de explosión por vapor en medio ácido en el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Vm = valor medio. Cv = coeficiente de variación. n = 4

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

miento de explosión por vapor en condiciones ácidas no produce pérdidas aditivas de glucosa con respecto al sustrato sin impregnar, esto puede sugerir la posibilidad de formación de algún inhibidor de la actividad enzimática durante el pretratamiento en dichas condiciones.

4.2.2.8. Pretratamiento biológico.

Además de por métodos físicos o químicos, como los descritos en apartados anteriores, existe la posibilidad de pretratar los materiales lignocelulósicos por métodos biológicos, empleando microorganismos capaces de crecer sobre dichos materiales, provocando transformaciones en su estructura que faciliten el posterior ataque por las enzimas celulolíticas. Es evidente que un pretratamiento de este tipo tiene como exigencia que los microorganismos responsables de dicha transformación respeten al máximo el contenido en celulosa de la materia prima. Los microorganismos capaces de desarrollarse utilizando selectivamente la lignina como fuente de energía son, en principio, los más adecuados para este tipo de pretratamiento ya que podría obtenerse como consecuencia del mismo un material deslignificado, rico en la fracción holocelulósica y por tanto de alto valor para su posterior sacarificación por hidrólisis enzimática.

Aunque este tipo de pretratamiento tiene algunas desventajas, como son los largos tiempos requeridos para el mismo, presenta las ventajas con respecto a los pretratamientos químicos y físicos derivadas de: la menor complejidad, menor consumo de agua, menor gasto energético, facilidad de manipulación del material fermentado y una menor inversión inicial de capital.

Debido al carácter aromático y a la naturaleza de los enlaces intermonoméricos, la lignina es uno de los materiales de origen biológico más resistente a la degradación. En consecuencia, existen relativamente pocos grupos de organismos con capacidad para degradarla o alterarla significativamente. Los únicos organismos que en la Naturaleza producen una importante degradación de materiales con alto contenido en lignina son ciertos basidiomicetos. Dentro de los basidiomicetos, se encuentran el grupo denominado en su conjunto "hongos de pudrición" o "podedrumbre blanca", que se caracterizan por la alteración y degradación de la lignina hasta CO₂ y agua, conjuntamente a la utilización de los restantes componentes mayoritarios del material. Los basidiomicetos de este grupo son los degradadores de lignina más eficaces que se conocen. Dentro de este grupo se encuentra el hongo *Phanerochaete chrysosporium* con el que se han llevado a cabo la mayor parte de los estudios sobre aspectos químicos y enzimáticos de la degradación de lignina (Buswell y Odier, 1987; Kirk y Farrel, 1987; Troller y col., 1988; Waldner y col., 1988; Kantelinen y col., 1988).

Dado que se ha descrito que *P.chrysosporium* es capaz de degradar lignina de maderas procedentes de gimnospermas y angiospermas así como también la lignina procedente de residuos agrícolas (Hatakka, 1983; Agosin y Odier, 1985; Bono y col., 1985; Rolz y col., 1988) se ha querido estudiar la posibilidad de utilizar este hongo como pretratamiento biológico previo a la hidrólisis enzimática de *O.nervosum*.

Parece ser que el proceso de degradación de la lignina ocurre tras el inicio del metabolismo secundario durante el cual el hongo puede sintetizar un sistema de enzimas ligninolíticas. El principal inconveniente con estos microorganismos es que utilizan, como cosustrato, la celulosa y hemicelulosa, por lo que los estudios realizados en este campo van dirigidos a encontrar mutantes y condiciones de cultivo que favorezcan la degradación de la lignina sin que la celulosa sea consumida en gran medida (Kirk y col., 1986). Con vistas a la aplicación de procesos de deslignificación es deseable que las actividades ligninolíticas, celolíticas y hemicelulolíticas sean de tal intensidad que se produzca una importante degradación de la lignina sin que la celulosa se llegue a degradar significativamente. En la iniciación o supresión del metabolismo secundario y por tanto de la degradación de la lignina, juega un papel importante la disponibilidad de nitrógeno en el medio, de forma que la degradación de la lignina sólo se produce en medios inicialmente pobres en nitrógeno o cuando éste se ha agotado (Fenn y Kirk, 1981; Fenn y col., 1981; Jeffries y col., 1981).

El estudio del pretratamiento biológico de *O.nervosum* previo a la hidrólisis con enzimas se ha llevado a cabo inoculando una suspensión de esporas de *P. chrysosporium*. El sustrato al que se añadió como única fuente de nitrógeno una solución de nitrato amónico al 25% hasta una relación de 1/3. El sustrato utilizado fue cardo tanto nativo como sometido a diferentes pretratamientos químicos (el procedimiento utilizado para la realización de este tipo de pretratamiento se recoge en el apartado correspondiente del capítulo de Materiales y Métodos).

Recuperación de material inicial.

En la figura 39 se encuentran recogidos los datos correspondientes a la pérdida de peso en función del tiempo de fermentación con *P.chrysosporium*, sobre cada uno de los sustratos estudiados (cardo nativo o sometido a diferentes pretratamientos químicos).

En el anexo III se muestran los análisis de varianza utilizados para comprobar los datos de porcentaje de insolubilización a lo largo de la fermentación.

Se observa claramente un marcado efecto en lo que respecta al tipo de sustrato sobre el que se realizó la fermentación con *P.chrysosporium*. Cuando la fermentación se realizó sobre sustrato nativo, las pérdidas de peso fueron mayores que para el resto de sustratos sometidos a los diferentes pretratamientos químicos. En el primer caso, las pérdidas de peso durante la primera semana fueron relativamente altas, aumentando solo ligeramente a partir de ésta. Cuando el sustrato sobre el que se realizó la fermentación fue tratado con un agente oxidante no se observó pérdida significativa de peso durante las primeras cuatro semanas ($p \leq 0,05$).

El crecimiento del hongo evaluado tanto por el aumento del contenido en nitrógeno total (figura 40) como por las pérdidas de peso seco del sustrato se produce fundamentalmente sobre cardo nativo. Asimismo, se aprecia la incapacidad del hongo para crecer sobre

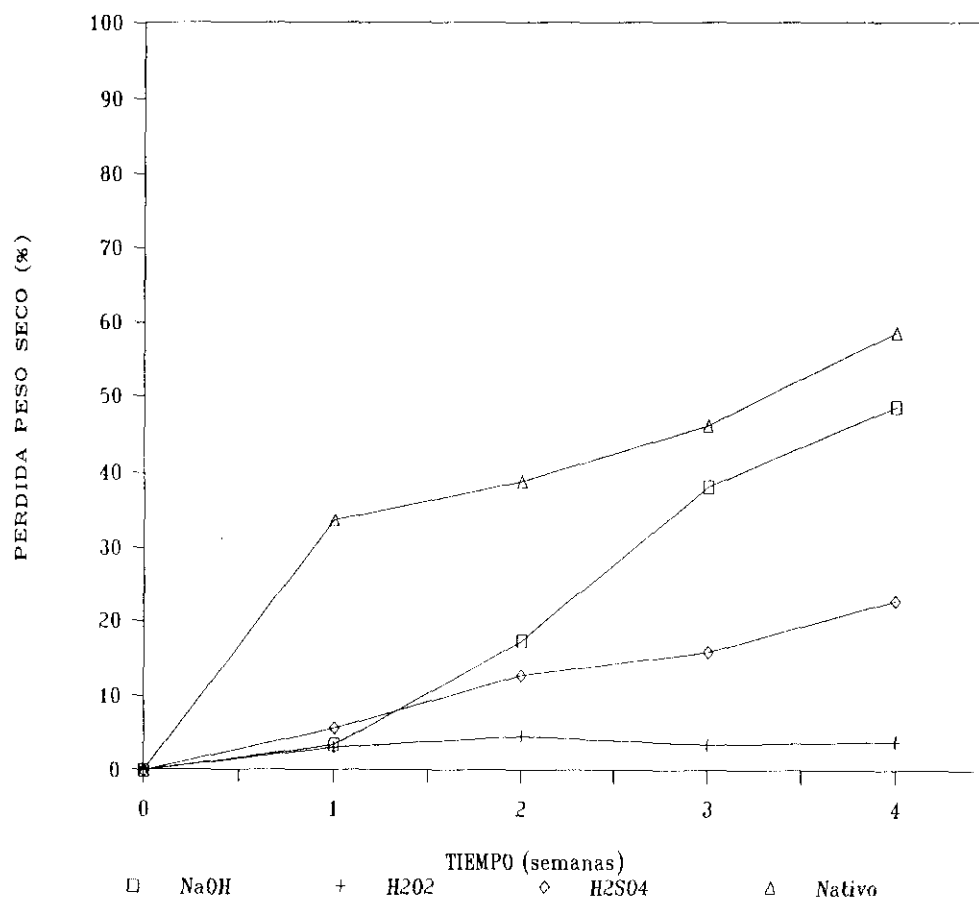


Figura 39. Influencia del tiempo de fermentación con *P.chrysosporium* en la pérdida de peso seco de *O.nervosum* nativo o sometido a diferentes pretratamientos.

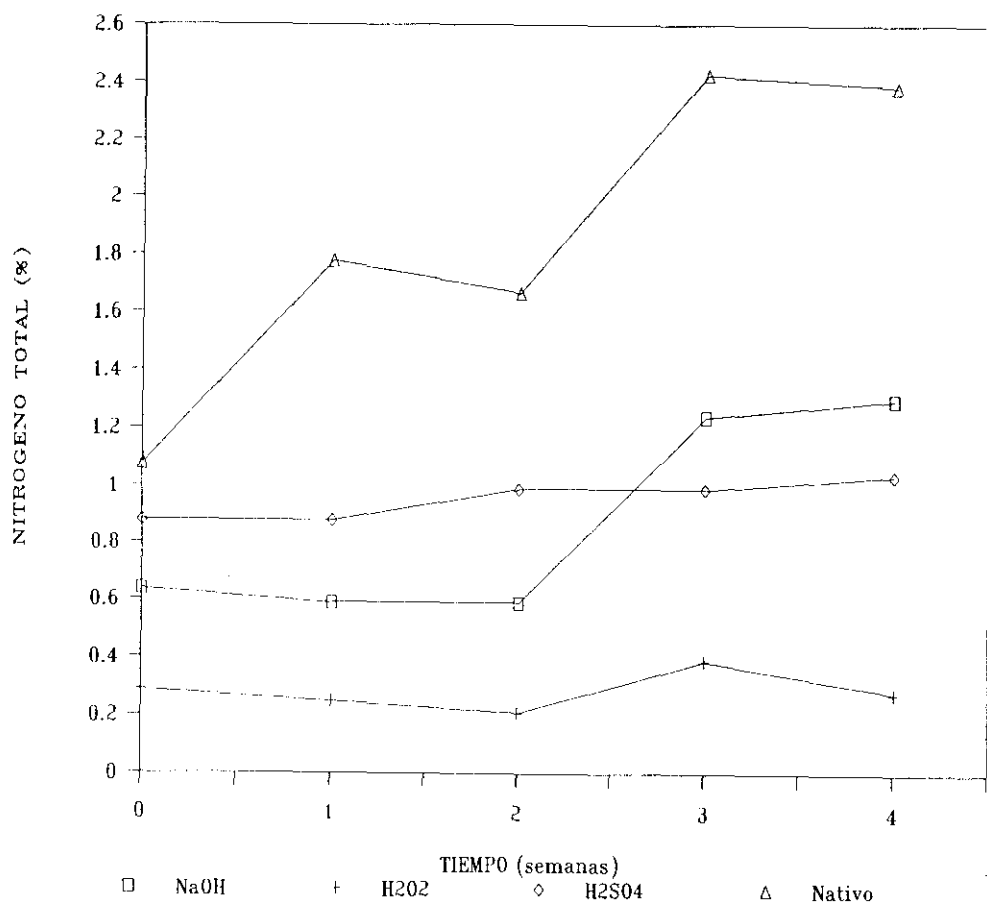


Figura 40. Influencia del tiempo de fermentación con *P.chrysosporium* en el contenido de nitrógeno total de *O.nervosum* nativo o sometido a diferentes pretratamientos.

el sustrato sometido a pretratamiento oxidante.

Recuperación de celulosa y lignina.

En las tablas LVI, LVII, LVIII y LIX se muestran los valores obtenidos en cuanto a la composición en glucosa, azúcares reductores y lignina (expresados en porcentaje sobre peso seco) de los residuos obtenidos después de la fermentación por *P.chrysosporium* sobre cada uno de los sustratos utilizados.

En el anexo III se muestran los análisis de varianza elaborados para comparar los datos de recuperación de celulosa, azúcares reductores y lignina a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre cada uno de los sustratos utilizados.

La influencia del tiempo de fermentación con *P.chrysosporium* en la composición de holocelulosa (referida a la composición inicial del sustrato) se muestra en las figuras 41 y 42 en las que se representan los valores de glucosa y azúcares reductores expresados como porcentajes del contenido inicial de los mismos.

Se obtuvieron mayores pérdidas de celulosa cuando la fermentación se realizó sobre cardo nativo. Durante la primera semana se recuperó solamente el $48,06 \pm 1,67$ % de la celulosa (expresado en % de glucosa) y, después de un tiempo de fermentación de 4 semanas, la recuperación de celulosa fue solamente del $21,69 \pm 0,74$ %, lo que indica que el hongo utiliza fundamentalmente celulosa para su crecimiento.

Cuando el tratamiento se realizó sobre material pretratado en medio básico, se obtuvieron pérdidas de hasta el $65,95 \pm 0,45$ % durante las cuatro semanas de crecimiento del hongo, estas pérdidas fueron menores cuando el crecimiento se realizó sobre sustrato pretratado en medio ácido ($35,76 \pm 1,84$ %).

Cuando se utilizó sustrato pretratado con agente oxidante no se encontraron pérdidas significativas, lo cual está de acuerdo con la baja capacidad de crecimiento del hongo sobre este tipo de sustrato.

En la figura 43 se muestra la influencia del tiempo de fermentación en la composición de lignina referida a la composición inicial del sustrato. Se observa cómo el crecimiento del hongo va acompañada de una tasa de deslignificación variable según los casos. Así, por ejemplo, cuando el hongo crece sobre cardo nativo se produce una deslignificación progresiva durante las cuatro semanas de crecimiento, alcanzándose una deslignificación del $73,42 \pm 0,75$ % después de cuatro semanas de crecimiento. En el caso de utilización de un sustrato tratado en medio ácido, la deslignificación se produce a partir de la segunda semana de

TIEMPO DE FERMENTACION (días)	% RECUPERACION DEL MATERIAL INICIAL (r)* Vm Cv	% GLUCOSA		% AZUCARES REDUCTORES		% LIGNINA	
		Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
0	-	35.07	(1.72)	58.86	(4.27)	17.90	(3.01)
7	66.27 (4.75) ^a	25.44	(0.41) ^a	45.03 ^a	(1.24) ^a	28.06	(3.77) ^a
14	61.14 (14.5) ^{ab}	25.13	(4.99) ^a	47.87	(3.32) ^a	22.55	(10.33)
21	53.87 ^c (3.52) ^{ac}	18.21	(1.20) ^b	32.64 ^c	(5.29) ^b	26.32	(3.05) ^a
28	41.29 ^c (3.92) ^{bc}	18.45	(5.86) ^b	29.77 ^c	(3.21) ^b	12.65	(5.72)

TABLA LVI Recuperación del material inicial (expresado como porcentaje en peso seco) (r) y composición de los residuos resultantes de la fermentación con *P. chrysosporium* sobre *O. nervosum* nativo.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n = 4 *n = 2

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

TIEMPO DE FERMENTACION (días)	% RECUPERACION DEL MATERIAL INICIAL (r)*		% GLUCOSA		% AZUCARES REDUCTORES		% LIGNINA	
	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
0	-		52.58	(0.64) ^a	65.34	(4.22) ^a	28.05	(1.51) ^a
7	94.30	(0.10) ^a	51.15	(1.47) ^a	66.73	(2.81) ^a	30.72	(2.93) ^a
14	87.21	(0.94) ^{ab}	48.38	(2.24) ^{ab}	66.02	(4.15) ^a	28.90	(3.10) ^a
21	84.04 ^c	(0.98) ^{bc}	45.47	(1.68) ^b	60.07	(3.79) ^a	39.03	(4.73) ^{ab}
28	77.24	(4.97) ^c	43.82	(6.91) ^b	59.33	(12.1) ^a	33.03	(2.18) ^b

TABLA LVII Recuperación del material inicial (expresado como porcentaje en peso seco) (r) y composición de los residuos resultantes de la fermentación por *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento ácido.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n = 4 *n = 2

Los valores seguidos de la misma letra: (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

TIEMPO DE FERMENTACION (días)	% RECUPERACION MATERIAL INICIAL (r)*		% GLUCOSA		% AZUCARES REDUCTORES		% LIGNINA	
	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
0	-		43.34	(3.94)	65.9a	(4.25) ^a	16.12	(3.58) ^a
7	96.57	(1.61)	38.62	(0.92) ^a	59.65	(3.37) ^b	18.24	(2.78) ^a
14	82.56	(0.44)	36.40	(3.19) ^a	59.77	(1.15) ^{ab}	17.42	(9.51) ^a
21	61.78	(5.25)	32.45	(1.36)	48.36	(3.58)	19.70	(8.74) ^a
28	51.33	(2.28)	28.76	(2.89)	40.51	(5.11)	18.40	(3.99) ^a

TABLA LVIII Recuperación del material inicial (expresado como porcentaje en peso seco) (r) y composición de los residuos resultantes de la fermentación por *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento alcalino.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación

n = 4 *n = 2

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

TIEMPO DE FERMENTACION (días)	% RECUPERACION MATERIAL INICIAL (r)*		% GLUCOSA		% AZUCARES REDUCTORES		% LIGNINA	
	VM	Cv	VM	Cv	VM	Cv	VM	Cv
0	-		41.85	(3.99) ^a	70.82	(3.51) ^a	13.99	(3.59) ^a
7	96.91	(0.10) ^a	42.26	(3.67) ^a	69.99	(2.32) ^{ab}	11.84	(11.9) ^{ab}
14	95.33	(0.52) ^a	41.75	(1.75) ^a	75.20	(6.42) ^b	11.00	(5.51) ^b
21	96.50	(0.10) ^a	41.63	(1.30) ^a	51.22	(10.5)	12.30	(5.78) ^{ab}
28	96.04	(0.36) ^a	40.71	(1.41) ^a	63.12	(2.08) ^a	10.97	(5.73) ^b

TABLA LIX Recuperación del material inicial (expresado como porcentaje en peso seco) (r) y composición de los residuos resultantes de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento oxidante.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%)

n = 4 *n = 2

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

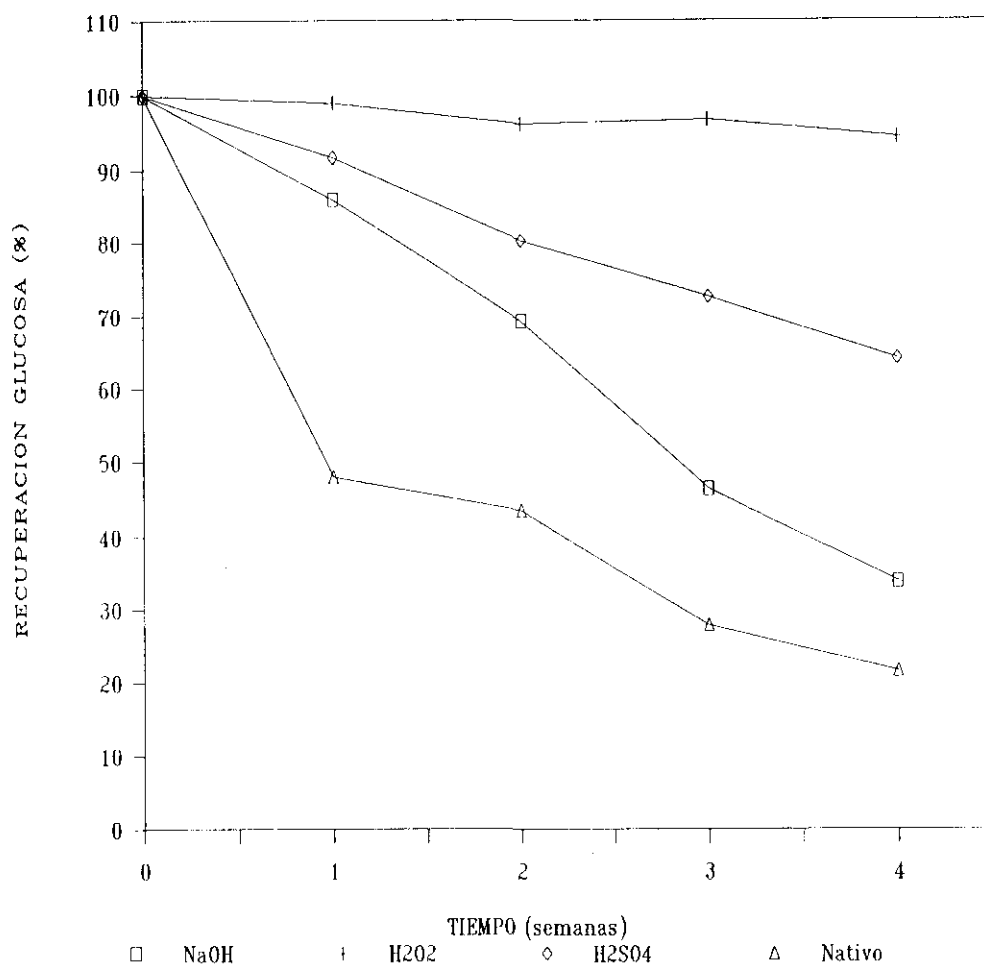


Figura 41. Influencia del tiempo de fermentación con *P.chrysosporium* en la recuperación de celulosa referida a la composición inicial del sustrato *O.nervosum* nativo o sometido a diferentes pretratamientos.

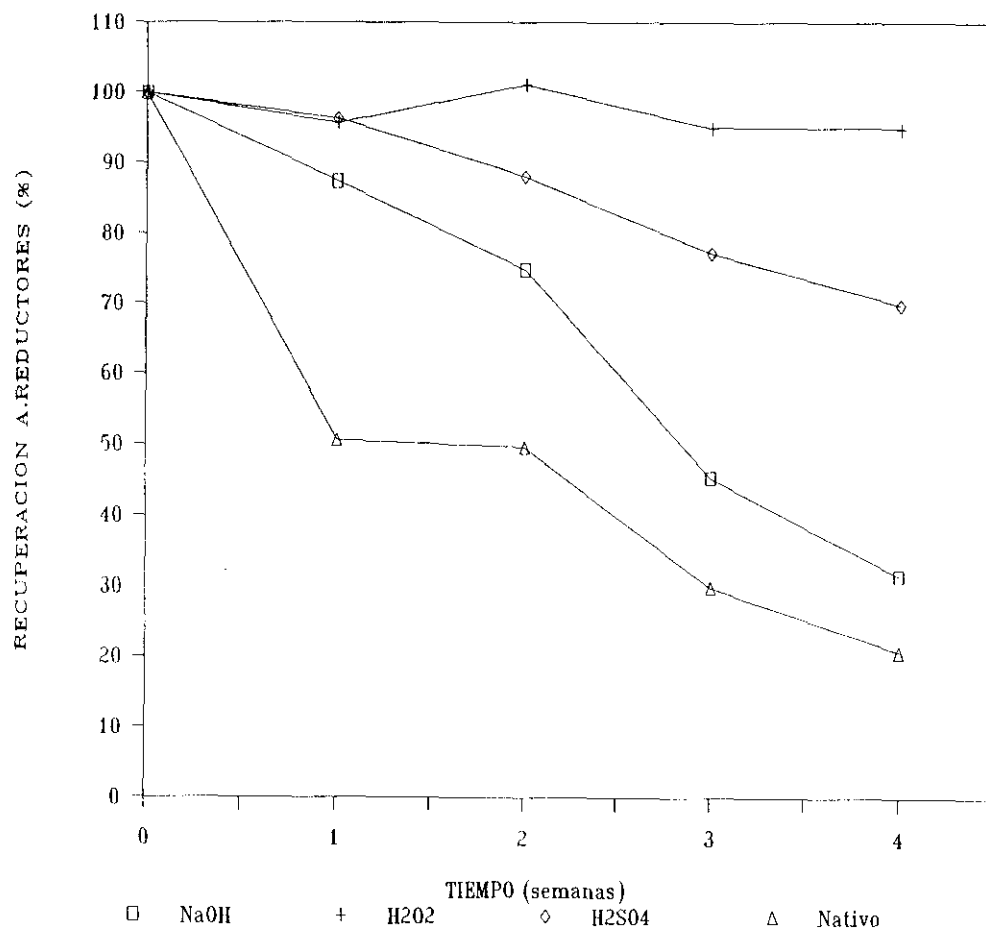


Figura 42. Influencia del tiempo de fermentación con *P.chrysosporium* en la recuperación de azúcares reductores referida a la composición inicial del sustrato *O.nervosum* nativo o sometido a diferentes pretratamientos.

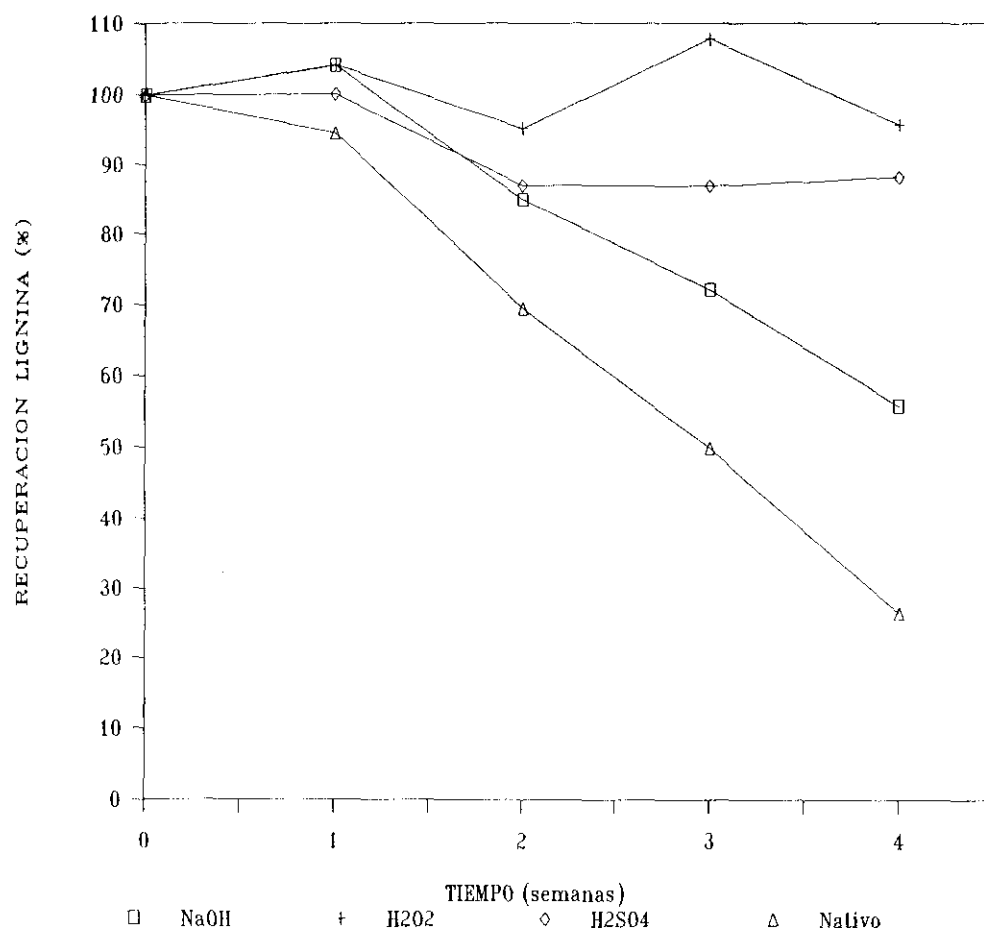


Figura 43. Influencia del tiempo de fermentación con *P.chrysosporium* en la recuperación de lignina referida a la composición inicial del sustrato *O.nervosum* nativo o sometido a diferentes pretratamientos.

crecimiento, no siendo ésta significativa durante las dos semanas siguientes (después de 4 semanas de crecimiento la deslignificación fue solamente del $9,73 \pm 1,81$ %). También, en el caso del crecimiento del hongo sobre sustrato tratado en medio básico, es a partir de la segunda semana cuando se empieza a producir deslignificación, alcanzando el $44,14 \pm 1,41$ % después de cuatro semanas de crecimiento.

Cuando el sustrato utilizado fue pretratado con agentes oxidantes no se produjo deslignificación significativa durante las cuatro semanas de crecimiento ($p \leq 0,05$).

Rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Producción de glucosa.

En las tablas LX y LXI se recogen los valores obtenidos de producción de glucosa y azúcares reductores respectivamente, después de la hidrólisis enzimática de los residuos obtenidos, a lo largo de la fermentación sobre cardo nativo o sometido a los diferentes pretratamientos químicos. Los rendimientos obtenidos en la hidrólisis enzimática muestran tal y como cabría esperar, de acuerdo con el patrón de utilización de las distintas fracciones de material lignocelulósico durante el crecimiento del hongo, la ineficacia de este tratamiento como fase previa a un proceso de hidrólisis enzimática.

En el anexo III se muestran los análisis de varianza correspondientes a estos ensayos. Salvo en el caso de la utilización del sustrato pretratado con agente oxidante, sobre el que se produce poco o ningún crecimiento del hongo, en el resto de los casos, la producción de glucosa fue menor que cuando el sustrato original no fue sometido a pretratamiento biológico. La elevada utilización de las fracciones más fácilmente solubilizables de componente holocelulósico previamente a la aparición de la actividad deslignificadora, convierte el material pretratado por este método, contrariamente al objetivo perseguido con su aplicación, en un sustrato empobrecido en el componente celulósico y constituido a su vez por celulosa más difícilmente hidrolizable por el sistema enzimático. La parcial deslignificación observada no parece contrarrestar estos efectos negativos originados como consecuencia del crecimiento del hongo.

Eficacia de sacarificación y conversión de celulosa en glucosa.

En las tablas LXII y LXIII se recogen los valores de eficacia de sacarificación y conversión de celulosa en glucosa respectivamente para cada una de las condiciones estudiadas. En el anexo III se muestran los análisis de varianza de estos índices.

Tal como cabría esperar a la vista de los bajos valores obtenidos en cuanto a la producción de glucosa, la eficacia de sacarificación disminuye con este tipo de pretratamiento. En el caso del sustrato sometido a pretratamiento con sosa se llegan a valores de eficacia de sacarificación de 2,9 veces menores que los correspondientes al sustrato nativo.

TIEMPO DE FERMENTACION (días)	NATIVO		ACIDO		ALCALINO		OXIDANTE	
	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
0	7,52	(4,21)	9,56	(2,72)	24,10	(4,07)	28,96	(2,86) ^a
7	3,89	(6,03)	4,65	(1,17)	21,64	(1,77) ^a	30,23	(1,44) ^a
14	4,80	(3,08)	6,98	(6,06) ^a	19,84	(5,28) ^a	28,22	(2,42) ^a
21	2,71	(4,36) ^a	6,66	(1,64) ^a	10,00	(7,52)	29,69	(1,20) ^a
28	2,59	(2,99) ^a	1,89	(4,42)	5,41	(4,89)	25,68	(1,28) ^a

TABLA LX. Producción de glucosa por hidrólisis enzimática (mg glucosa/100 mg sustrato) de los residuos resultantes de la fermentación por *P. chrysosporium* de *O.nervosum* nativo o sometido a diferentes pretratamientos.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%).

n = 4.

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

TIEMPO DE FERMENTACION (días)	NATIVO		ACIDO		ALCALINO		OXIDANTE	
	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
0	11,17	(3,36)	11,92	(4,16)	35,89	(3,40)	34,36	(1,34) ^a
7	4,36	(1,63) ^a	4,23	(2,55) ^a	26,71	(2,92)	33,66	(2,94) ^a
14	5,80	(8,24)	6,97	(9,25) ^b	23,43	(7,91)	32,38	(6,48) ^a
21	3,80	(2,17) ^a	7,10	(8,55) ^b	13,03	(2,98)	32,70	(2,49) ^a
28	3,74	(1,66) ^a	3,79	(2,08) ^a	5,94	(5,71)	28,00	(1,86)

TABLA LXI Producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática (mg/100 mg sustrato) de los residuos resultantes de la fermentación por *P. chrysosporium* de *O. nervosum* nativo o sometido a diferentes pretratamientos.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%).

n = 4

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

TIEMPO DE FERMENTACION (dias)	NATIVO		ACIDO		ALCALINO		OXIDANTE	
	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
0	21,44	(4,03) ^a	18,19	(2,73)	55,60	(4,08) ^a	69,22	(2,87) ^a
7	15,31	(5,69) ^b	9,10	(1,81)	56,03	(2,50) ^a	71,59	(2,78) ^{ab}
14	19,14	(2,93) ^a	14,43	(7,53) ^a	54,49	(2,53) ^a	67,60	(1,91) ^{ab}
21	14,90	(4,95) ^b	14,64	(2,65) ^a	30,81	(6,31)	70,96	(1,20) ^a
28	14,06	(5,78) ^b	4,34	(11,1)	18,90	(4,17)	63,09	(1,41) ^b

TABLA LXII. Valores de eficacia de sacarificación (%) de los residuos resultantes de la fermentación por *P. chrysosporium* de *O. nervosum* nativo o sometido a diferentes pretratamientos.
Vm = valor medio
Cv = coeficiente de variación (%).
n = 4.
Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

TIEMPO DE FERMENTACION (dias)	NATIVO		ACIDO		ALCALINO		OXIDANTE	
	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv	Vm	Cv
0	21,44	(4,03)	18,19	(2,73)	55,60	(4,08)	69,21	(2,87) ^a
7	7,35	(2,36)	8,35	(1,19)	48,19	(1,03)	70,01	(1,45) ^a
14	8,36	(9,47)	11,57	(5,70) ^a	37,79	(4,94)	64,29	(2,06)
21	4,16	(2,51) ^a	10,64	(1,32) ^a	14,22	(3,27)	68,46	(1,16)
28	3,03	(4,27) ^a	2,78	(8,36)	6,40	(4,21)	58,94	(1,13)

TABLA LXIII. Valores de conversión de celulosa en glucosa (%) de los residuos resultantes de la fermentación por *P. chrysosporium* de *O. nervosum* nativo o sometido a diferentes pretratamientos.

Vm = valor medio

Cv = coeficiente de variación (%).

n = 4

Los valores seguidos de la misma letra (dentro de la misma columna), no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

En cuanto a los valores de conversión de celulosa en glucosa, que son más representativos del rendimiento global del proceso, ya que contempla no sólo la eficiencia del ataque enzimático sino también las pérdidas de material ocurridas durante el pretratamiento, se observa que la disminución con el tiempo es más drástica.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que la utilización de un pretratamiento biológico de material lignocelulósico encaminado a aumentar el rendimiento de una hidrólisis enzimática posterior, requiere la selección cuidadosa de microorganismos y condiciones de fermentación que permitan una utilización selectiva de la fracción de lignina respetando al máximo el contenido en celulosa de las fibras, sustratos potenciales de la acción hidrolítica de las enzimas.

4.2.2.9. Estudio comparativo de la eficacia de los distintos pretratamientos.

En este apartado y para facilitar la comparación entre los distintos pretratamientos aplicados a la biomasa del cardo *O. nervosum* se recogen los resultados de recuperación de material y rendimiento de hidrólisis para las condiciones óptimas dentro de cada uno de los pretratamientos. En la tabla LXIV se recogen las condiciones de operación de los pretratamientos seleccionados.

En la figura 44 se recogen los datos de recuperación de material inicial, así como los de recuperación de los distintos componentes analizados (glucosa, azúcares reductores y lignina) en los residuos sólidos obtenidos después del pretratamiento.

Los datos sobre rendimientos de hidrólisis se presentan expresados tanto en función del peso seco del sustrato pretratado (figura 45) como del contenido en celulosa de dicho sustrato (figura 46). En la figura 46 se representan asimismo los valores de conversión de celulosa en glucosa para los distintos pretratamientos.

Como queda reflejado en la figura 44, tanto con los pretratamientos de tipo físico (radiación gamma y explosión por vapor) como con el pretratamiento en medio acuoso a 150°C no se produce deslignificación apreciable del sustrato, además los residuos sólidos pretratados por estos métodos son los que presentan una mayor relación lignina/celulosa. Con los pretratamientos de tipo químico se producen ligeras deslignificaciones que variaron entre el 15 y 30% salvo en el caso del pretratamiento oxidante en el que se produjeron las mayores deslignificaciones (alrededor del 60%), siendo el residuo correspondiente a este último tratamiento el que presenta la relación lignina/celulosa menor.

En algunos pretratamientos químicos (alcalino a 100°C y etanol) y en el tratamiento de explosión con vapor en condiciones ácidas, se produjeron elevadas recuperaciones de la fracción de celulosa, siendo total en el caso del tratamiento con etanol. En el resto de los pretratamientos las pérdidas de celulosa variaron entre 25 y 40%.

En todos los casos, se produjo una marcada pérdida de hemicelulosa (valorada indirectamente a partir de los azúcares reductores), siendo ésta bastante evidente en los tratamientos alcalinos, con agua a 150°C y de explosión por vapor. Los residuos correspondientes a estos tipos de pretratamiento presentaban los valores de relación glucosa/azúcares reductores más elevados, mientras que los más bajos corresponden a los pretratamientos oxidante y de irradiación.

PRETRATAMIENTO	CONDICIONES OPERATIVAS	REFERENCIA EN LAS FIGURAS
AUTOCLAVE	Autoclave, 150°C, 5 horas	TEMP
ALCALINO	NaOH 1%, 100°C, 10 minutos	ALC 1
ALCALINO	NaOH 1%, 150°C, 10 minutos	ALC 2
OXIDANTE	H ₂ O ₂ 1% hasta pH 11,6, 25°C, 24 horas	OX
ACIDO	CH ₃ -COOH 1%, 70°C, 3 horas	AC
IRRADIACION	Irradiación en medio acuoso a 50 Mrad.	RAD
IRRADIACION Y POSTERIOR TRATAMIENTO CON ACIDO	Irradiación en seco a 20 Mrad y posterior tratamiento con HCl 1%, 100°C, 5 horas	RAD + AC
SOLVENTE	Etanol:NaOH 1N (1:1), 120°C, 1 hora	SOLV
EXPLOSION VAPOR	230°C, 1 minuto	EV
EXPLOSION VAPOR EN CONDICIONES ACIDAS	H ₂ SO ₄ , 1%, 170°C, 2 minutos	EV + AC

TABLA LXIV. Condiciones de operación de los pretratamientos seleccionados como más efectivos para la biomasa de *O. nervosum*.

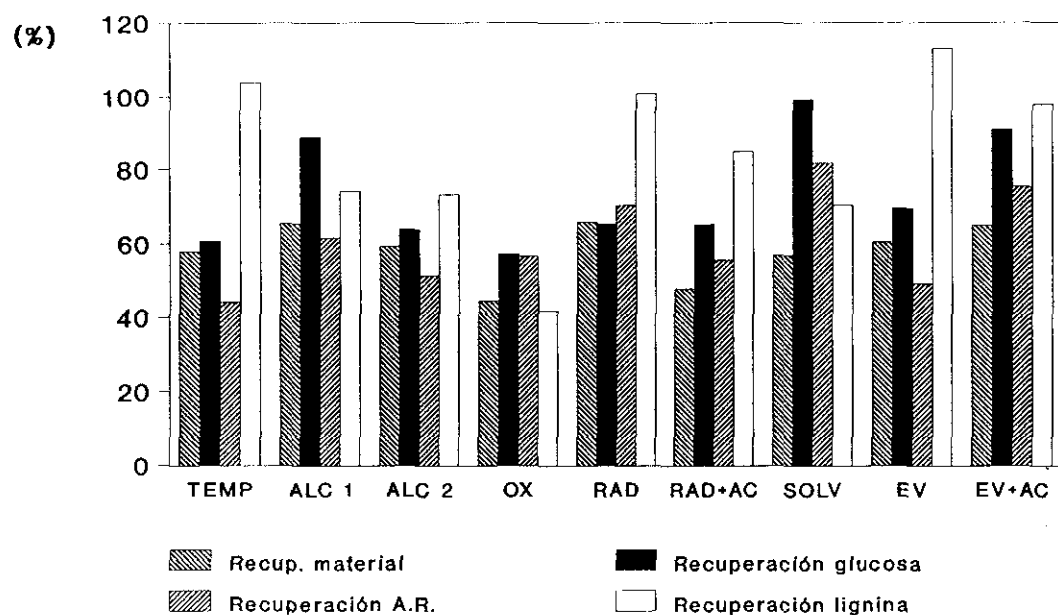


Figura 44. Efecto del tipo de pretratamiento de la biomasa de *O. nervosum* en el porcentaje de recuperación del material inicial (expresado como peso seco) y en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina.

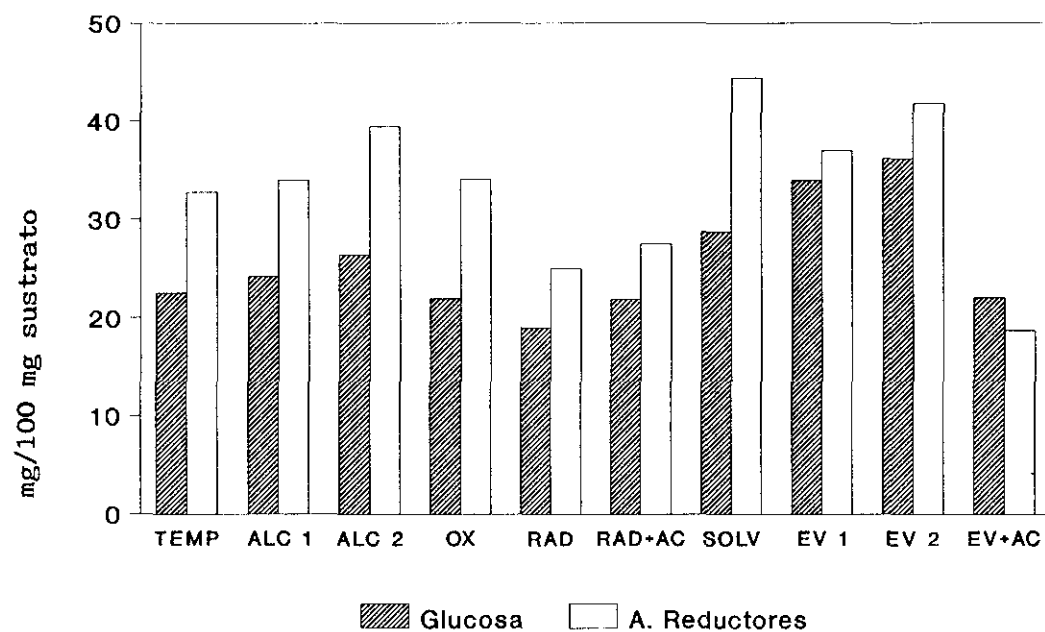


Figura 45. Efecto del tipo de pretratamiento de la biomasa de *O.nervosum* en la producción de glucosa y azúcares reductores (mg/100 mg de sustrato pretratado) por hidrólisis enzimática.

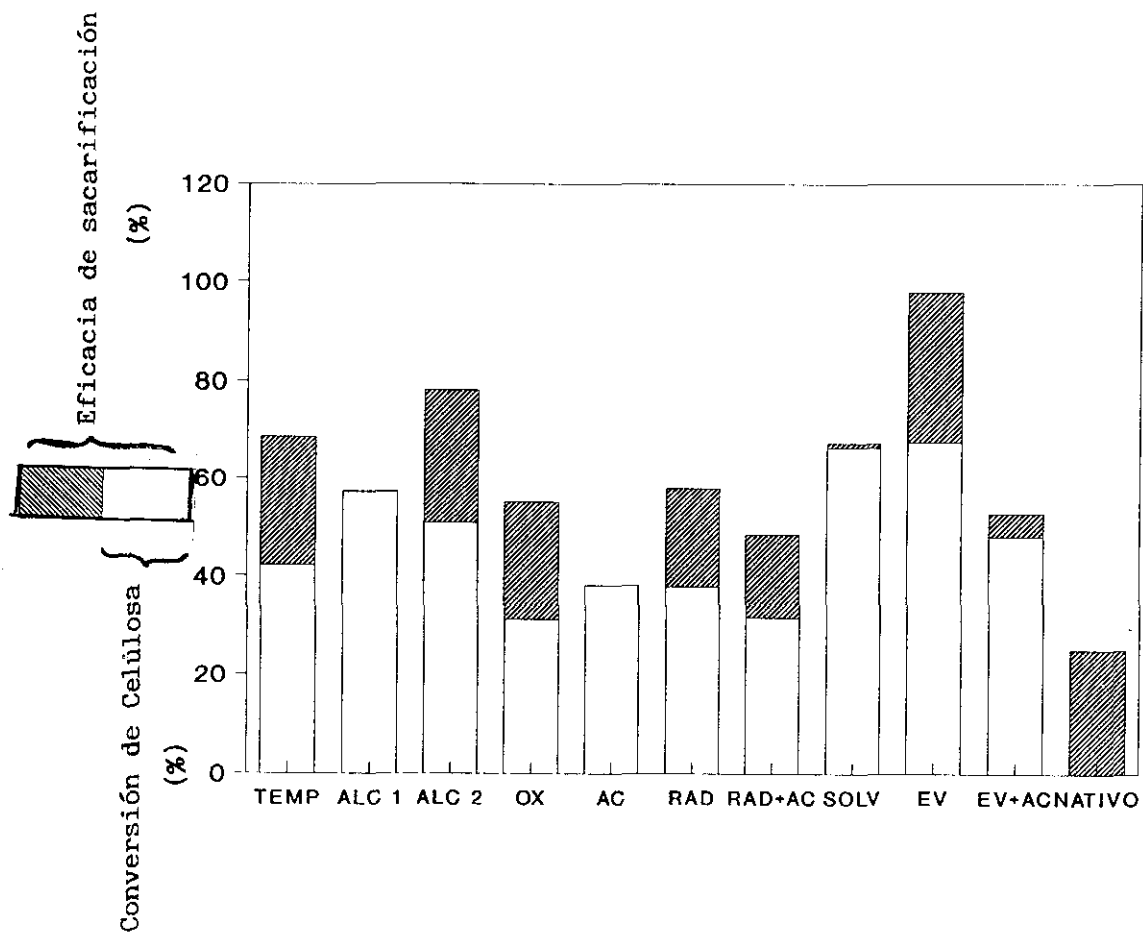


Figura 46. Influencia del tipo de pretratamiento de la biomasa de *O. nervosum* en la eficacia de sacarificación (ES) y conversión de celulosa en glucosa (CC) por hidrólisis enzimática.

Con respecto al rendimiento de hidrólisis enzimática expresado como liberación de glucosa en el medio de hidrólisis ensayado (figura 45), las máximas producciones se obtuvieron para el pretratamiento de explosión por vapor, siendo éstas casi 5 veces mayores a la correspondiente al sustrato nativo.

En cuanto a los índices eficiencia de sacarificación y conversión de celulosa en glucosa (figura 46), el pretratamiento de explosión con vapor es el que presenta los valores más elevados, seguido por los pretratamientos con álcali y etanol. En estos dos últimos casos, los valores de conversión de celulosa en glucosa se aproximan a los de eficacia de sacarificación debido a que las pérdidas de celulosa fueron muy pequeñas. Los residuos obtenidos después del tratamiento de explosión por vapor presentaban elevada proporción de lignina y pequeña proporción de hemicelulosa.

4.3. Seguimiento del proceso de hidrólisis de O.nervosum pretratado.

Se ha estudiado la relación entre el porcentaje de hidrólisis, tiempo de reacción y dosis de enzima. Para ello se ha utilizado el *O.nervosum* pretratado de acuerdo a las condiciones óptimas seleccionadas en el apartado anterior. Estas fueron:

Pretratamiento: explosión de vapor.

Temperatura: 210°C.

Tiempo: 1 minuto.

El seguimiento del proceso de hidrólisis se realizó durante un periodo de tiempo entre 1 y 94 horas, utilizando una concentración de sustrato de 50 g/l (C_0) y añadiendo dosis variables de enzima (5-40 UI/g sustrato).

La concentración de glucosa y celobiosa en el hidrolizado se determinó por HPLC. La concentración de celulosa hidrolizada Y (g/l) se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$Y = [\text{glu}] 0,9 + [\text{cel}] 0,95.$$

donde [glu] y [cel] son la concentración de glucosa y celobiosa en el hidrolizado expresado en g/l.

El rendimiento de la hidrólisis se expresó como la relación entre la celulosa hidrolizada y la concentración inicial de sustrato expresado como porcentaje ($100Y/C_0$).

En la figura 47 se muestran las cinéticas de hidrólisis del *O. nervosum* pretratado para distintas relaciones enzima-sustrato. Se observa un comportamiento bifásico caracterizado por una etapa inicial de hidrólisis rápida hasta aproximadamente 10-12 horas, seguida de una etapa más lenta. El rendimiento de hidrólisis aumentó después de 94 horas de hidrólisis desde el 15,3% (5UIPF/g sustrato) hasta el 36,6% (40 UI/g sustrato).

En la figura 48 se muestra el efecto de la dosis de enzima en el rendimiento de hidrólisis ($100Y/C_0$) después de 24 y 48 horas. Se observa que alrededor del 70% del máximo rendimiento obtenido se consigue para valores de actividad enzimática de 10UIPF/g, siendo necesario aumentar la concentración de enzima 3-4 veces para conseguir el 30%

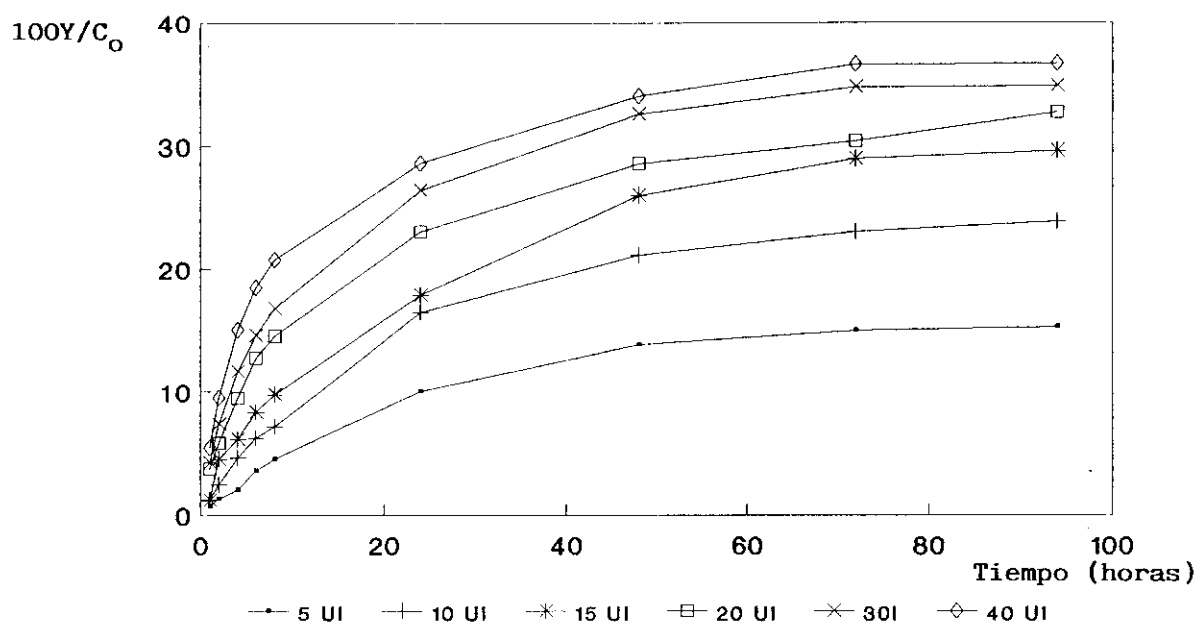


Figura 47. Cinética de hidrólisis del *O.nervosum* pretratado con diferentes concentraciones de enzima.

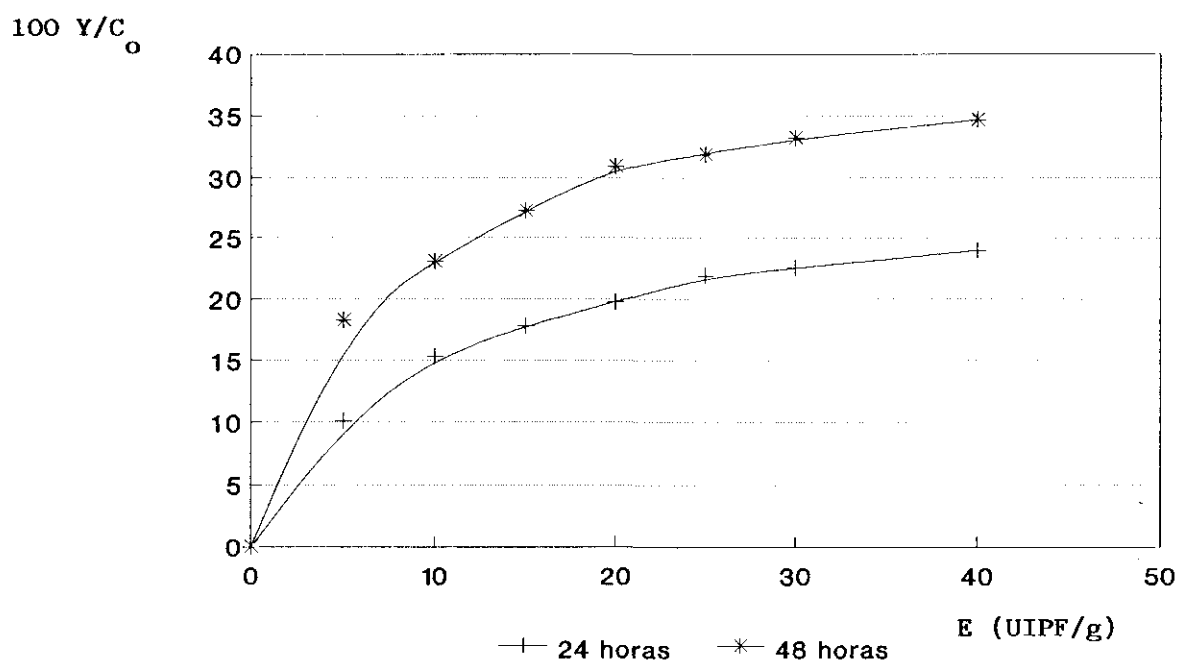


Figura 48. Efecto de la dosis de enzima en el rendimiento de la hidrólisis del *O.nervosum* pretratado después de 24 y 48 horas.

restante. Esto debe tenerse en cuenta a la hora de aplicar procesos de hidrólisis y decidir si, desde el punto de vista técnico y económico resulta más interesante utilizar mayor actividad de enzima o, el elevado coste de las enzimas aconseja su utilización en menor proporción, a pesar de que el rendimiento final del proceso disminuya.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos y discutidos en el apartado anterior se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- La producción de enzimas celulolíticas utilizando cultivos de *Trichoderma longibrachiatum* QM9414 ha mostrado los mejores rendimientos cuando se utilizó como fuente carbonada un sustrato celulósico puro. Empleando biomasa de *Onopordum nervosum* como sustrato hidrocarbonado para la producción de enzimas, se observaron los mejores resultados cuando dicho sustrato fue sometido a pretratamiento ácido. La presencia de sustratos lignocelulósicos en el medio influye negativamente tanto en la duración del proceso como en la manipulación de los cultivos debido a la mayor dificultad de crecimiento sobre dichos materiales y a la baja densidad de los mismos.

2.- Las condiciones óptimas de actividad del complejo enzimático obtenido se encontraron para rangos de pH y temperatura comprendidos entre 4,3-4,8 y 50-55°C respectivamente. La preparación enzimática utilizada presentó una elevada estabilidad en las condiciones de hidrólisis seleccionadas (pH 4,8 , temperatura 50°C y tiempo de reacción 48 horas). La β -glucosidasa, en particular, conservó el 90% de su actividad después de 72 horas en dichas condiciones. Los estudios cinéticos de la actividad β -glucosidasa utilizando como sustrato celobiosa y p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido muestran un comportamiento cinético de Michaelis-Menten. El modelo de inhibición de esta enzima por glucosa, ha resultado ser de naturaleza competitiva.

3.- *Onopordum nervosum*, especie seleccionada para este trabajo como material lignocelulósico de interés debido a sus características de crecimiento, productividad y composición, presenta en su forma nativa, bajos rendimientos de hidrólisis enzimática. Empleando las enzimas celulolíticas de *T. longibrachiatum* se obtuvieron porcentajes de hidrólisis de su fracción celulósica inferiores al 23%. Estos resultados indican la necesidad de someter esta biomasa a pretratamientos previos al proceso de hidrólisis con objeto de favorecer la acción hidrolítica así como aumentar la concentración de celulosa en el material pretratado a fin de obtener hidrolizados de más elevada concentración.

4.- La mayoría de los pretratamientos químicos y físicos utilizados incrementan considerablemente el rendimiento de transformación por hidrólisis enzimática. El tratamiento biológico con *Phanerochaete chrysosporium*, debido a la elevada utilización de la fracción celulósica por parte del hongo, así como el pretratamiento alcalino con hidróxido cálcico han presentado efectos negativos sobre dicho sustrato.

Entre los pretratamientos de tipo químico (alcalinos, ácidos, oxidantes y orgánicos) los que han producido mejores resultados han sido los pretratamientos alcalinos con hidróxido sódico y los pretratamientos con solventes orgánicos.

5.- El pretratamiento alcalino con hidróxido sódico aumenta considerablemente la digestibilidad enzimática, pero a costa de importantes pérdidas de materia seca, siendo característica en este tipo de pretratamiento una rápida solubilización durante los primeros 10 minutos de reacción en el rango de temperaturas y tiempos estudiados. Los mejores resultados se lograron en condiciones de tratamiento relativamente suaves (100°C, 1% NaOH, 10 minutos). En estas condiciones, se produjo una deslignificación del 26% y una pérdida de celulosa del 11%. El rendimiento de azúcares por hidrólisis enzimática aumentó desde 68 gramos de glucosa por kilogramo de sustrato nativo hasta 158 gramos de glucosa por kilogramo de sustrato nativo.

6.- En general, con el pretratamiento con solventes orgánicos se obtuvieron reducidas pérdidas de celulosa, produciéndose además ligeras deslignificaciones (rango de deslignificación obtenido 14-34%) siendo mayores éstas cuando se utilizó butanol como solvente. En las condiciones óptimas de pretratamiento se incrementó la producción de glucosa por hidrólisis enzimática en un factor de 2,8 respecto al sustrato nativo.

7.- El estudio de la eficacia del pretratamiento de irradiación sobre el rendimiento de la hidrólisis enzimática muestra que aunque éste puede aumentar hasta 2,6 veces, las pérdidas considerables que experimenta la fracción de celulosa se traducen en un rendimiento final del proceso poco satisfactorio. El tratamiento ácido posterior a la irradiación potencia sólo en algunos casos el efecto positivo de la misma, sobre todo a dosis de 20 Mrad. En general, a dosis mayores no se incrementa la acción de la irradiación.

8.- La técnica de explosión por vapor ha mostrado ser el pretratamiento más eficaz para la biomasa lignocelulósica de *O. nervosum*. La presencia de lignina, cuyas pérdidas son escasas o nulas durante el pretratamiento de dicho sustrato, no parece a la vista de los resultados, constituir en el material pretratado una barrera para el acceso de las enzimas a la fracción celulósica. No se observa incremento de la eficacia de sacarificación ni de la conversión de celulosa en glucosa cuando se realiza el tratamiento de explosión de vapor sobre biomasa previamente impregnada con ácido sulfúrico, no existiendo además pérdidas adicionales de celulosa en dichas condiciones.

9.- El máximo rendimiento de transformación por hidrólisis enzimática ha sido obtenido cuando la biomasa lignocelulósica fue pretratada por explosión con vapor a 130°C durante 1-2 minutos. En estas condiciones, se hidroliza más del 90% de la glucosa potencial contenida en el material pretratado. Este rendimiento equivale a una producción de 204 gramos de glucosa por kilogramo de biomasa seca inicial que comparado con la obtenida

para el sustrato nativo, supone un valor final de transformación en glucosa tres veces superiores. Aunque los rendimientos globales podrían mejorarse considerablemente si se redujeran las pérdidas de glucosa durante el pretratamiento, las características específicas de la planta de explosión por vapor utilizada no han permitido realizar una selección más precisa de las condiciones (temperatura, tiempo de reacción) del pretratamiento.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA.

- AGOSIN, E. and ODIER, E. (1985). Solid-state fermentation, lignin degradation and resulting digestibility of wheat straw fermented by selected white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, p. 397-403.
- AGUILERA, J.M. and SAN MARTIN, R. (1985). Steam hydrolysis of Pine (*Pinus radiata*) sawdust. *Biomass* 8, p.301-313.
- ALFANI, F.; CANTARELLA, M.; and SCARDI, V. (1983). Enzymatic saccharification of native cellulose: effect of product inhibition and biomass pretreatment. In: *Solar Energy R+D in the European Community 5E. Energy from biomass*, p. 336-343.
- ALLEN, D.C.; GRETHLEIN, H.E. and CONVERSE, A.O. (1984). Process desing and economic evaluation for the production of glucose from enzymatic hydrolysis of acid pretreated mixed hardwood. *Solar Energy* 33, p. 175-186.
- ALLEN, R. and SJÖSTRÖM, E. (1985). Degradative conversion of cellulose- containing materials into useful products. In: *Cellulose Chemistry and its applications*. T.P. Nevell and S. Haig Zeronian (Eds.). J. Wiley & Sons. New York, p. 531-544.
- ASENJO, J.A. and JEW, C. (1983). Primary metabolite or microbial protein from cellulose: conditions, kinetics, and modeling of the silmultaneous saccharification and fermentation to citric acid. *Annals N.Y. Academy of Sciences* 413, p. 211-217.
- BAILEY, M.J. and RÄTTÖ, M. (1982). Production and some properties of cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Proc. Symp. Bioconvesion of plant raw material by microorganisms*. Helsingin. Mickrobiologian Laitakenjukasija 26, p. 107-107.
- BAILEY, M.J. and NEVALAINEN , K.M.N. (1981). Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 3, p. 153-158.
- BEGUIN, P.; PETRE, P.; MILLET, J.; LONGIN, R.; GIRARD, H. RAYNAUD, O.; ROCANCOURT, M.; GREPINET, O. and AUBERT, J.D. (1985). Cloning and analysis of genes involved in cellulose degradation by *Clostridium thermocellum*. *Energy from Biomass*, 3td E.C. Conference. W. Palz, J. Coombs, D.O. Hall (Ed). Elservier Applied Science. London and New York, p. 651-654.
- BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J.; ROMBOUTS, F.M. and PILNIK, W (1988). Syneregism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biotechnol. Bioeng.* 31, p. 173-178.
- BERGERON, P. and WERDENE, P. (1989). The progressing batch reactor. In: *Ethanol from biomass annual review meeting*. Solar Energy Research Institute, January 17-19, p. A12-A23.
- BHATTACHARYA, S.; BISWAS, P.K. and TOLBERT, M.E.M. (1987). Comparison of the effectiveness of various pretreatment methods on the enzymatic hydrolysis of sweet potato (*Ipomoea batata L.*) biomass. *Biological Wastes* 19, p. 215-226.

- BISARIA, V.S. and GHOSE, T.K. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.* 3, p. 90-104.
- BLACK, S.; JOHNSON, D.K. and CHUM, H.L. (1987). Organosolv pretreatment. In: Biochemical conversion program annual review meeting. Solar Energy Research Institute, October 13-15, p. B77-B92.
- BLACK, S.; JOHNSON, D.K. and CHUM, H.L. (1989). Organosolv pretreatment. In: Ethanol from biomass annual review meeting. Solar Energy Research Institute, January 17-19, p. B195-B213.
- BLANCO, M.J. (1990). Producción de celulasas a partir de dos cepas hiperproductoras de *Trichoderma longibrachiatum*: QM9414 y Rut-C-30. *Report-CIEMAT* n°666.
- BLANCO, S.; GAMARRA, A.; CUEVAS, C. and ELLENRIEDER, G.(1982). Ethanol production by coupled saccharification and fermentation of sugar cane bagasse. *Biotechnol. Lett.* 4, p. 661-666.
- BONO, J.J.; GAS, G. and BOUDET, A.M. (1985). Pretreatment of poplar lignocellulose by gamma-ray or ozone for subsequent fungal biodegradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, p. 227-234.
- BOTANY, C.A.S.; MAHADEVAM, A.; VASUDEVAN, N. and WILLIAM, F. (1987). Degradation of lignins by microorganisms. *Anales de II Seminario sobre "Hidrólisis Enzimática de Biomassas"*. Flavio Faria de Moraes y Gisella Zanin (Eds.). Univ. de Maringa (Brasil). Vol. II, p. 459-460.
- BROWNELL, H.H. and SADDLER, J.N. (1984). Steam explosion pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 14, p. 55-68.
- BROWNELL, H.H. and SADDLER, J.N. (1987). Steam pretreatment of ligno-cellulosic material for enhanced enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 29, p. 228-235.
- BROWNELL, H.H.; YU, E.K.C. and SADDLER, J.N. (1986). Steam-explosion pretreatment of wood: effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. *Biotechnol. Bioeng.* 28, p. 792-801.
- BUSWELL, J.A. and ODIER, E. (1987). Lignin biodegradation. *C.R.C. Critical Rev. in Biotechnol.* 6, p. 1-60.
- CALO, J.M. and HRADIL, G. (1989). Hydrodynamic studies of hydrolysis reactors. In: Ethanol from biomass annual review meeting. Solar Energy Research Institute, January 17-19, p. A24-A34.
- CAMINAL, G.; LOPEZ-SATIN, J. and SOLA, C. (1985). Kinetics modeling of the enzymatic hydrolysis of pretreated cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 27, p. 1282-1290.
- COLAÇO, M.T.A. and PEREIRA, H. (1985). Enzymatic hydrolysis and SCP production from solvent delignified *Eucalyptus globulus* L. biomass. Energy from Biomass, 3rd E.C. Conference. W. Palz, J. Coombs, D.O. Hall (Eds). Elsevier Applied Science. London and New York, p. 707-711.
- COLLMER, A. and WILSON, D.B. (1983). Cloning and expression of a *Thermonospora* YX endoglucanase gene in *E.coli*. *Bio/Technology* 1 (7), p. 594-601.
- COMITE ENERGIA (1982). Instituto de Ingeniería de España. Fuentes de Biomasa con fines energéticos.

- COOMBS, J.; HIND, G.; LEEGOOD, R.G.; TIESZEN, L.L. and VONAHAK, A. (1985). Analytical techniques. In: *Techniques in Bioproducity and Photosynthesis*. J. Coombs, D.O. Hall, S.P. Long, J.M. Oscurlock (ed.) Pergamon Press. Oxford, p. 219-228.
- CHANG, W. (1971). Folding chain model and annealing of cellulose. *J. Poly. Sci., Part C*, 36, p. 343-62.
- CHANG, M.M.; CHOU, T.Y.C. and TSAO, G.T. (1981). Structure, pretreatment and hydrolysis of cellulose. *Adv. Biochem. Eng.* 20, p. 15-41.
- CHUM, H.L.; DOUGLAS, L.J.; FEINBERG, D.A. and SCHROEDER, H.A. (1985). Evaluation of pretreatments of biomass for enzymatic hydrolysis of cellulose. Informe SERI, TR-231-2183, 68 pp.
- CHUM, H.L.; JOHNSON, D.K.; BLACK, S.K.; BAKER, J.; GROHMANN, K.; SARKANEN, K.V.; WALLACE, K. and SCHROEDER, H.A. (1988). Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars: I. Enzyme hydrolysis of cellulosic residues. *Biotechnol. Bioeng.* 31, p. 643-649.
- CHUM, H.L.; JOHNSON, D.K.; BLACK, S.K. and OVEREND, R.P. (1990). Pretreatment-catalyst effects and the combined severity parameter. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25, p. 3-14.
- DEKKER, R.F.H. (1986). Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial β -D-Glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 28, p. 1438-1442.
- DEKKER, R.F.H. and WALLIS, A.F.A. (1983). Enzymic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis-steam explosion. *Biotechnol. Bioeng.* 25, p. 3027-3048.
- DESHPANDE, V.; SIVARAMAN, H. and RAO, M. (1983). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol using *Penicillium funiculosum* cellulase and free or immobilized *Saccharomyces uvarum* cells. *Biotechnol. Bioeng.* 25, p. 1679-1684.
- DETROY, R.W.; LINDENFELSER, L.A.; SOMMER, S. and ORTON, W.L. (1981). Bioconversion of wheat straw to ethanol: chemical modification, enzymatic hydrolysis and fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 23, p. 1527-1535.
- DURAND, H.; TIRABY, G. and POURQUIE, J. (1984). Amélioration génétique de *Trichoderma reesei* en vue d'une production industrielle de cellulases. In: *La génétique des microorganismes industriels*. 9^{ème} colloque de la Société Française de Microbiologie (Société Française de Microbiologie). Paris, p. 39-50.
- EL-DIWANY, A.I.; SHAKER, H.M.; FARID, M.A. and EL-ABD, H.A. (1986). Effect of chemical treatment on the saccharification of rice hulls and yeast growth. *Agricultural Wastes* 18, p. 137-143.
- ENARI, T.M. (1983). Microbial Cellulases. In: *Microbial Enzymes and Biotechnology*. W.M. Fogarty and C.T. Kelly (Eds). Applied Science Publishers. London-New York, pp. 183-223.
- ENARI, T.M.; KIKU-PAAVOLA, M.L.; HARJU, L.; LAPPALAINEN, A. and NUMMI, M. (1981). Purification of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* β -glucosidase. *J. Appl. Biochem.* 3, p. 157-163.
- ENARI, T.M.; MARKKANEN, P. and KORHONEN, E. (1975). In : *Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose* (M.Bailey, T.M. Enari and M. Linko, eds.), SITRA, Helsinki, p.171.

- ERIKSSON, K.E. (1979) In: Microbial Polysaccharides and Polysaccharases. R.C.W. Berkeley, G.W. Gaudy and D.C. Cuwood (Eds). Academic Press. London, p. 285.
- ERIKSSON, K.E. and PETTERSSON, B. (1975). Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. I: Separation, purification and physicochemical characterization of five endo-1,4,β-glucanase. *Eur.J. Biochem.* 51, p. 193-206.
- ESTERBAUER, H.; STEINER, W.; LABUDOVA, I.; HERMANN, A. and HAYN, M. (1991). Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology* 36, p. 51-65.
- EVANS, C.S. (1985). Properties of the β-D-glucosidase (cellobiase) from the wood-rotting fungus, *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, p. 128-131.
- FADDA, M.B.; DESSI, M.R.; MAURICI, R.; RINALDI, A.; and SATTA, G. (1984). Highly efficient solubilization of natural lignocellulosic materials by a commercial cellulase immobilized on various solid supports. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, p. 306-331.
- FAN L.T.; GHARPURAY, M.M. and LEE, Y.H. (1987). Enzymatic hydrolysis. In: Cellulose hydrolysis. Biotechnology monographs, vol 3. S. Aiba, L.T. Fan, A. Fiechter, J. Klein and Schügerl (Eds). Springer-Verlag. Berlin, London, p. 21-120.
- FAN, L.T. and LEE, Y.H. (1983). Kinetics studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: derivation of a mechanistic kinetics model. *Biotechnol. Bioeng.* 25, p. 2707-2733.
- FAN, L.T.; LEE, Y.H. and GHARPURAY, M.M. (1982). The nature of ligno- cellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.* 23, p. 157-187.
- FEIST, W.E.; BAKER, A.J. and TARKOW, H. (1970). Alkali requirements for improving digestibility of hardwoods by rumen microorganism. *J. Anim. Sci.* 30, p. 832-835.
- FENN, P. CHOI, S. and KIRK, T.K. (1981). Ligninolytic activity of *Phanerochaete chrysosporium*: Physiology of supression by NH₄⁺ and L-glutamate. *Arch. Microbiol.* 130, p. 66-71.
- FENN, P. and KIRK, T.K. (1981). Relationship of nitrogen to the onset and suppresion of lignolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 130, p. 59-65.
- FERCHAK J.D. and PYE, E.K. (1983). Effect of cellobiose, glucose , ethanol and metal ions on the cellulase enzyme complex of *Thermomonospora fusca*. *Biotechnol. Bioeng.* 25, p. 2865-2872.
- FERNANDEZ, J.(1980). La agricultura como productora de energía Química. *Ingeniería Química*. Nov. 1980, p. 23-32.
- FERNANDEZ, J. (1982).En "Energías Renovables y Medio Ambiente". Centro de Estudios de Ordenación del Territorio y Medio Ambiente. Monografía 16, p. 53-62.
- FINCH, P. and ROBERTS, J.C. (1985). Enzymatic degradation of cellulose. In: Cellulose Chemistry and its Applications. T.P. Nevell and S. Haig Zeronian (Eds). J. Wiley & Sons. New York, p. 312-343.
- FREER, S.N. and WING, R.E. (1985). Fermentation of cellodextrins to ethanol using mixed-culture fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 27, p. 1085-1088.
- FUJII, M. and SHIMIZU, M. (1986). Synergism of endoenzyme and exoenzyme on hydrolysis of soluble cellulose derivatives. *Biotechnol. Bioeng.* 28, p. 878-882.

- FUJIKAWA, S.; YOKOTA, T. and KOGA, K. (1988). Immobilization of β -glucosidase in calcium alginate gel using genipin as a new type of cross-linking reagent of natural origin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, p. 440-441.
- FURCHT, P.W. and SILLE, H. (1990). Comparison of simultaneous wet milling and enzymatic hydrolysis of cellulose in ball mill and attrition mill reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 35, p. 630-645.
- GENENCOR, INC (1990). Molecular biology of the CBHII cellulase enzyme. Final Report to Solar Energy Institute. Subcontract n^o HK-7-07122-1, 37 pp.
- GHARPURAY, M.M.; FAN, L.T. and LEE, Y.Y. (1983). Caustic pretreatment study for enzymatic hydrolysis of wheat straw. Wood and Agricultural Residues Research on Use for Feed, Fuels and Chemicals. Ed by Isoltes. Academic Press. pp. 369-389.
- GHOSE, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.* 59, p. 257-268.
- GHOSE, T.K. and KOSTICK, J.A. (1970). A model for continuous enzymatic saccharification of cellulose with simultaneous removal of glucose syrup. *Biotechnol. Bioeng.* 12, p. 921-946.
- GHOSE, T.K.; ROYCHOUDHURY, P.K. and GHOSH, P. (1984). Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosics to ethanol under vacuum cycling and step feeding. *Biotechnol. Bioeng.* 26, p. 377-381.
- GHOSE, T.K.; SELWAMP, P.V. and GHOSE, P. (1983). Catalytic solvent delignification of agricultural residues: organic catalysts. *Biotechnol. Bioeng.* 25, p. 2577-2590.
- GHOSH, V. K.; GHOSE, T.K. and GOPALKRISHNAM, K.S. (1982) Improvement of *T. reesei* strain through mutation and selective screening techniques. *Biotechnol. Bioeng.* 24, p. 241-243.
- GHOSH, P.; PAMMENT, N.B. and MARTIN, W.R.B. (1982). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose: effect of β -D-glucosidase activity and ethanol inhibition of cellulase. *Enzyme Microb. Technol.* 4, p. 425-430.
- GLICK, B.R. and PASTERNAK, J.J. (1989). Isolation, characterization and manipulation of cellulase genes. *Biotech. Adv.* 7, p. 361-386.
- GOMEZ, R.F. (1982). *Clostridium thermocellum* as an ethanol producer: its characteristics and current and future research. Informe SERI/CP- 1520, p. 65-69.
- GONG, C.S. and TSAO, G.T. (1979). Cellulase and biosynthesis regulation. In: annual reports on fermentation processes, 3. D.Perlman (Ed.). Academic Press. New York, pp. 111-140.
- GONG, C.S.; MAUN, C.M. and TSAO, G.T. (1981). Direct fermentation of cellulose to ethanol by a cellulolytic filamentous fungus *Monilia* sp. *Biotechnol. Lett.* 3, p. 77-82.
- GONZALEZ, G.; CAMINAL, G.; DE MAS, C. and LOPEZ SANTIN, J. (1989): An approach in mathematical modeling of an upflow packed-bed reactor for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, p. 242-251.
- GONZALEZ SATILLANA, R. (1978). Valor nutritivo de la paja de cereal y su mejora mediante tratamiento con alcali. Nuevas fuentes de alimentos para la producción animal. A. Gómez Cabrera y J.L. García Siles (Ed.). ETSIA. Córdoba. Octubre 1978.

- GOULD, J.M. (1984). Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhanced enzymatic saccharification. *Biotechnol. Bioeng.* 26, p. 46-52.
- GOULD, J.M. and FREER, S.N. (1984). High-efficiency ethanol production from lignocellulosic residues pretreated with alkaline H₂O₂. *Biotechnol. Bioeng.* 26, p. 628-631.
- GRETHLEIN, H.E. (1985). The effect of pore size distribution on the rate enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Bio/Technology* 3, p. 155-160.
- GRETHLEIN, H.E.; ALLEN, D.C. and CONVERSE, A.O. (1984). A comparative study of the enzymatic hydrolysis of acid-pretreated white pine and mixed hardwood. *Biotechnol. Bioeng.* 26, p. 1498-1505.
- GRIANFREDA, L. and GRECO, C. (1980). Agricultural Waste Treatment by means of Ultrafiltration Membrane Enzymatic Reactors. In: Energy from biomass. 1st. E.C. Conference. W. PALZ, P. CHANTIER and D.O. HALL (Eds). Applied Science Publishers LTD. London, p. 306-310.
- GROHMANN, K.; HIMMEL, M.; RIVARD, C.; TUCKER, M.; BAKER, J.; TORGET, R. and GRABOSKI, M. (1984). Chemical-mechanical methods for the enhance utilization of straw. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 14, p. 139-157.
- GROHMANN, K.; TORGET, R. and HIMMEL, M. (1985). Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 15, p. 59-80.
- GROHMANN, K.; TORGET, R. and HIMMEL, M. (1989). Dilute acid pretreatment of biomass. In: Ethanol from biomass annual review meeting. Solar Energy Research Institute, January 17-19, p. B13-32.
- GROHMANN, K.; TORGET, R.; WRIGHT, J. and HIMMEL, M. (1987). Dilute acid pretreatment of biomass. In Biochemical conversion program annual review meeting. Solar Energy Research Institute, October 13-15, p. B13-B37.
- GROUS, W.R.; CONVERSE, A.O. and GREITHLEIN, H.E. (1986). Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme Microb. Technol.* 8, p. 274-280.
- GUSAKOV, A.V.; SINITSYN, A.P. and KLYOSOV, A.A. (1985a). Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process. *Enzyme Microb. Technol.* 7, p. 346-352.
- GUSAKOV, A.V.; SINITSYN, A.P. and KLYOSOV, A.A. (1985b). Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for the process in a plug-flow column reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 7, p. 383-388.
- GUSAKOV, A.V.; SINITSYN, A.P. and KLYOSOV, A.A. (1987). Factors affecting the enzymatic hydrolysis of cellulose in batch and continuous reactors: computer simulation and experiment. *Biotechnol. Bioeng.* 29, p. 906-910.
- HADJIPANAYIOTOU, M. (1984). Effect of level and type of alkali on the digestibility "in vitro" of ensiled, chopped barley straw. *Agricultural Wastes* 10, p. 187-194.
- HAN, Y.W.; CATALANO, E.A. and CIEGLER, A. (1983b). Chemical and physical properties of sugarcane bagasse irradiated with gamma rays. *J. Agric. Food Chem.* 31, p. 34-88.
- HAN, Y.W. and CIEGLER, A. (1982). Use of nuclear wastes in utilization of lignocellulosic biomass. *Process Biochem.* 17 (1), p. 32-42.

- HAN, Y.W.; CHO, Y.K. and CIEGLER, A. (1983a). Effect of gamma-ray irradiation on alcohol production from corn. *Biotechnol. Bioeng.* 25, p. 2631-2640.
- HATAKKA, A.I. (1983). Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, p. 350-357.
- HOLTZAPPLE, M.T. and HUMPHREY, A.E. (1984). The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. *Biotechnol. Bioeng.* 26, p. 670-676.
- HONDA, H.; NAITO, H. ; TAYA, M. ; FIJIMA, S. and KOBAYASHI, T. (1987). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Thermoanaerobacter cellulolyticus* gene coding for heat-stable β -glucanase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, p. 480-483.
- HOWELL, J.A. and STRUCK, J.D. (1975). Kinetics of Solka Floc hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulases. *Biotechnol. Bioeng.* 17, p. 873-893.
- HSU, T.; GONG, C. and TSAO, G. (1980). Kinetics studies of cellodextrins hydrolysis by exocellulases from *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Bioeng.* 22, p. 2305-2320.
- IBRAHIM, M.N.M. and PEARCE, G.R. (1984). A soak-and-press method for the alkali treatment of fibrous crop residues. Evaluation of sodium hydroxide-treated rice straw fed to sheep. *Agricultural Wastes* 9, p. 17-33.
- JEFFRIES, T.W.; CHOI, S. and KIRK, T.K. (1981). Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Env. Microbiol.* 42, p. 290-296.
- JOHNSON, E.A.; SAKAJOH, M.; HALLIWELL, M.; MADIA, A. and DEMAINE, A.L. (1982). Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, p. 1125-1132.
- JURASEK, L. (1979). Enzymic Hydrolysis of Pretreated Aspen Wood. *Dev. Ind. Microb.* 20, p. 177-183.
- KADAM, K.L. and DREW, S.W. (1986). Study of lignin biotransformation by *Aspergillus fumigatus* and white-rot fungi using ^{14}C -labeled and unlabeled kraft lignins. *Biotechnol. Bioeng.* 28, p. 394-404.
- KANTELINEN, A.; WALDNER, R.; NIKU-PAAVOLA, M.L. and LEISOLA, M.S.A. (1988). Comparison of two lignin-degrading fungi: *Phlebia radiator* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, p. 193-198.
- KAWAKISHI, S.; KITO, Y. and NAMIKI, M. (1977). Radiation-induced degradation of D-glucose in anaerobic condition. *Agric. Biol. Chem.* 41, p. 951-957.
- KAWAMORI, M.; MORIKAWA, Y. and TAKASAWA, S. (1986). Induction and production of cellulases by L-sorbose in *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, p. 449-453.
- KHAN, A.W.; LABRIE, J.P. and McKEOWN, J. (1986). Effect of electron-beam irradiation pretreatment on the enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol. Bioeng.* 28, p. 1449-1453.
- KIRK, T.K.; CROAN, S.; TIEN, M.; MURTAGH, K.E. and FARRELL, R.L. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: Effect of selected grown conditions and use of mutant strain. *Enzyme Microb. Technol.* 8, p. 27-32.
- KIRK, T.K. and FARRELL, R.L. (1987). Enzymatic "combustion". The microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, p. 465-505.

- KLEINERT, T.N. and TAYENTHAL, K. (1932). Process of decomposing vegetable fibrous matter for the purpose of the simultaneous recovery both of the cellulose and of the incrusting ingredients. US PATENT 1, 856,567.
- K OSARIC, N.; WIECZOREK, A.; COSENTINO, G.P.; MAGEE, R.J.; PRENOSIL, J.E. (1983). Ethanol Fermentation. In: *Biotechnology*, 3. H.Dellweg (Eds). Verlag Chemie. Weinheim, p. 257-385.
- KUMAKURA, M. and KAETSU, I. (1978). Radiation-induced decomposition and enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 20, p. 1309-1315.
- KUMAKURA, M. and KAETSU, I. (1979). Radiation-induced decomposition and subsequent hydrolysis of waste cellulose materials. *Int. J. Radiat. Isotopes* 30, p. 139-141.
- KUMAKURA, M. and KAETSU, I. (1982). Radiation degradation and subsequent enzymatic hydrolysis of waste papers. *Biotechnol. Bioeng.* 24, p. 991-997.
- KUMAKURA, M. and KAETSU, I. (1983). Effect of radiation pretreatment of bagasse on enzymatic and acid hydrolysis. *Biomass* 3, p. 199-208.
- KUMAKURA, M. and KAETSU, I. (1984). Pretreatment by radiation and acids of chaff and its effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Agricultural Wastes*, 9, p. 279-287.
- KUMAKURA, M.; KOJIMA, T. and KAETSU, I. (1982). Pretreatment of lignocellulosic wastes by combination of irradiation and mechanical crushing. *Biomass* 2, p. 299-308.
- LABUDOVA, I. ; FARKAS, V. ; BAUER, S. KOLAROVA, N. and BRANYIK, A. (1981). Characterization of cellulolytic enzymes complexes obtained from mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12, p. 16-21.
- LADISCH, M.R. ; HONG, J. ; VOLOCH, M. and TSAO, G.T. (1981). Cellulases kinetics. In: *Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals*. A. Hollaender and R.Rabson (Eds.). Publishing Corporation. New York, p. 55-83.
- LEE, S.B.; ARMIGER, W.B. ; WATTEEUW, C.M. and HUMPHRES, A.E. (1978) . *Biotechnol. Bioeng.* 20 , pp 1416.
- LEE, S.B.; SHIN, H.S., RYU, D.D.Y. and MANDELS, M. (1982). Adsorption of cellulase on cellulose: effect of physicochemical properties of cellulase on adsorption and rate of hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 24, p. 2137-2153.
- LEE, Y.H.; ROBINSON, C.W. and MOO-YOUNG, M. (1987). Evaluation of organosolv processes for the fractionation and modification of corn stover for bioconversion. *Biotechnol. Bioeng.* 29, p. 572-581.
- LEE, J.M. and WOODWARD, J. (1983). Properties and application of immobilized β -D-glucosidase coentrapped with *Zymomonas mobilis* in calcium alginate. *Biotechnol. Bioeng.* 25, p. 2441-2451.
- LINKO, M. (1977). An evaluation of enzymatic hydrolysis of cellulosic materials. *Adv. Biochem. Eng.* 5, p. 26-48.
- LOBARZEWSKY, J. and PASZCZYNSKI, A. (1985). Lignocellulose bio- transformation with immobilized cellulase D-glucose oxidase and fungal peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 7, p. 564-566.
- LOEWENBERG, J.R. (1984). Sophorose induction of an intracellular β -glucosidase in *Trichoderma*. *Arch. Microbiol.* 137, p. 53-57.

- LOVE, D.R. and STREIFF, M.B. (1987). Molecular cloning of a β -glucosidase gene from an extremely thermophilic anaerobe in *E.coli* and *B. subtilis*. *Bio/Technology* 5, p. 384-387.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, p. 265-75.
- MCDONALD, D.G.; BAKHSHI, N.N.; MATHEWS, J.F.; ROYCHOWDHURY, A.; BAJPAI, P. and MOO-YONG, M. (1983). Alkali Treatment of corn stover to improve sugar production by enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 25, p. 2067-2076.
- MACRIS, B.J. (1984). Production and characterization of cellulase and β -glucosidase from a mutant of *Alternaria alternata*. *Appl. Env. Microbiol.* 42, p. 560-565.
- MACRIS, B.J. and GALIOTOU-PANAYOTOU, M. (1986). Enhanced cellobiohydrolase production from *Aspergillus ustus* and *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.* 8, p. 141-144.
- MANDELS, M. (1982). Cellulases. Annual Reports on Fermentation Processes, 5, G.T. Tsao (Ed.). Academic Press, New York, p. 35-78.
- MARCHESSAULT, R.H.; MALHATRA, J.L.; JONES, A.Y. and PEROVIC, A. (1983). The wood explosion process: characterization and uses of lignin/cellulose products. In: Wood and Agricultural Residues Research on use for feed, fuels and chemicals. Ed. by J. Soltes. Academic Press. New York, London, p. 401-413.
- MARTIN, C.; NEGRO, M.J.; ALFONSEL, M.; SAEZ, F.; SAEZ, R. and FERNANDEZ, J. (1985). Study of enzymatic hydrolysis of alkali pretreated *Onopordum nervosum*. Energy from Biomass, 3rd E.C. Conference. W. Palz, J. Coombs, D.O. Hall (Ed). Elsevier Applied Science. London and New York, p. 994-999.
- MARTINEZ, L. y RODRIGUEZ, S. (1985). Residuos agrícolas: panorámica actual de su aprovechamiento. *Química e Industria*. 31. 6, p. 419-422.
- MILLER, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, p. 426-428.
- MILLETT, M.A.; BAKER, A.J. and SATTER, L.D. (1976). Physical and chemical pretreatments for enhancing cellulose saccharification. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* n 6, p. 125-154.
- MISHRA, S. and GOPALKRISHNAM, K.S. (1984). New method for isolation of cellulase constitutive mutants in *T.reesei* and partial characterization of one. *J. Ferment. Technol.* 62, p. 459-500.
- MISHRA, S. ; GOPALKRISHNAN, K.S. and GHOSE, T.K. (1982). A constitutively cellulase-producing mutants of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Bioeng.* 24, p. 251-254.
- MISHRA, C.; RAO, M.; SEETA, R.; SRINIVASAN, M.C. and DESHPANDE, V. (1984). Hydrolysis of lignocelluloses by *Penicillium funiculosum* cellulase. *Biotechnol. Bioeng.* 26, p. 370-373.
- MONTENECOURT, B. (1983). *Trichoderma reesei* cellulases. *Trends in Biotechnology* 1, p. 156-167.
- MONTENECOURT, B.S. and EVELEIGH, D.E. (1979). Production and characterization of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. TAPPI Annual Meeting Proceeding, Technical Association of the Pulp and Paper Industry. Atlanta, p. 101-108.
- MOORE, W.E.; EFFLAND, M.J. and MILLETT, M.A. (1972). Hydrolysis of wood and cellulose with cellulolytic enzymes. *J. Agr. Food Chem.* 20, p. 1173-1779.

- MORJANOFF, P.J. and GRAY, P.P. (1987). Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. *Biotechnol. Bioeng.* 29, p. 733-741.
- NAIM, N.; ISMAIL, A.S.; SALAM, L.A. and EL-REFAI, A.H. (1986). Enzymatic saccharification of sodium hypochlorite treated bagasse and cotton stalks. *Agricultural Wastes* 16, p. 103-111.
- NELSON, N. (1944). A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, p. 375-80.
- NEVALAINEN, K.M.; PALVA, E.T. and BAILEY, M.J. (1980). A high cellulase producing mutant strain of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.* 2, p. 59-60.
- NG, T.K. and ZEIKUS, J.G. (1982). Thermophilic degradation of cellulosic biomass. Informe SERI/CP-1520, p. 71-82.
- NIGAM, P.; PANDEY, A. and PRABHU, K.A. (1987). Cellulase and ligninase production by Basidiomycete culture in solid-state fermentation. *Biological Wastes* 20, p. 1-9.
- NISIZAWA, T. ; SUZUKI, M. ; NAKAYAMA, M. and NISIZAWA, K. (1971). Inductive formation of cellulose by sophorose in *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* 70 , p. 375-385.
- OHLSON, I.; TRÄGARDG, G. and HAHN-HÄGERDAL, B. (1984). Enzymatic hydrolysis of sodium hydroxide-pretreated sawlog in an ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 26 ,p. 647-653.
- OKAZAKI, M. and MOO-YOUNG , M. (1978). Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose: analytical description of a mechanistic model. *Biotechnol. Bioeng.* 20, p. 637-63.
- OOSHIMA, H.; BURNS, D.S. and CONVERSE, A.O. (1990). Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignocellulosic residues in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. *Biotechnol. Bioeng.* 36, p. 446-452.
- PEITERSEN, N. (1975). Production of cellulase and protein from barley straw by *Trichoderma viride*. *Biotechnol. Bioeng.* 17, p. 361-374.
- PHILLIPS, G.O. and ARTHUR, J.C. (1985). Photochemistry and radiation chemistry of cellulose. In: Cellulose Chemistry and its applications .T.P. Nevell and S. Haig Zeronian (Eds.). J. Wiley & Sons. New York, p. 290-311.
- PLAYNE, M.J. (1984). Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion. *Biotechnol. Bioeng.* 26, p. 426-433.
- POURQUIE, J. and VANDECASTEELE, J. (1990). Development of an industrial process of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. In: Biomass for Energy and Industry, 5th EC Conference. G. Grassi, G. Gosse and G. Dos Santos (Eds.). Elsevier Applied Science. London and New York, vol. 2, p. 52-58.
- PRITCHARD, G.I.; PIGDEN, W.J. and MINSON, D.J. (1962). Effect of gamma-irradiation on the utilization of wheat straw by rumen microorganisms. *Can. J. Animal Sci.* 42, p. 215-217.
- PULS, J.; AYLA, C. and DIETRICH, H.H. (1983). Chemicals and ruminant feed from lignocelluloses by the steaming extraction process. *Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium* 37, p. 685-695.
- PULS, J.; POUTANEN, K.; KÖRNER, H.U. and VIIKARI, L. (1985) . Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, p. 416-423.

- PURI, V.P. and HAMERS, H. (1983). Explosive pretreatment of ligno- cellulosic residues with high-pressure carbon dioxide for the production of fermentation substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 25, p. 3149-3161.
- RAO, M.; SEETA, R. and DESPHANDE, V. (1983). Effect of pretreatment on the hydrolysis of cellulose by *Penicillium funiculosum* cellulase and recovery of enzyme. *Biotechnol. Bioeng.* 25, p. 1863-1871.
- REESE, E.T.; SIU, R.G.H. and LEVINSON, H.S. (1950). The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* 59, p. 485-497.
- REXEN, F.; VESTERGAARD K. and THOMSEN, K. (1976). The effect on digestibility of a new technique for alkali treatment of straw. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 1, p. 73-83.
- RIVERS, D.B. and EMERT, G.H. (1988). Factors affecting the enzymatic hydrolysis of bagasse and rice straw. *Biological Wastes* 26, p. 85-95.
- RODRIGUEZ, H.; VOLFOVÁ, O. and KLYOSOV, A. (1988). Characterization of the cellulase complex from *Cellulomonas* grown on bagasse pith. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, p.394-397.
- ROLZ, C.; DE LEON, R. and ARRIOLA, M.C. (1988). Biological pretreatment of coffee pulp. *Biological Wastes* 26, p. 97-114.
- ROLZ, C.; DE ARRIOLA, M.C.; VALLADARES, J. and DE CABRERA, S. (1986). Effects of some physical and Chemical Pretratments on the composition and enzymatic hydrolysis and dygestibilyty of lemon grass and citronella bagasse. *Agricultural Wastes* 18, p. 145-161.
- RYU, D.D.; KIM, C. and MANDELS, M. (1984). Competitive adsorption of cellulase components and its significance in synergistic mechanism. *Biotechnol. Bioeng.* 26, p. 488-496.
- SADDLER, J.N.; BROWNELL, H.H.; CLEMORT, L.P.; LEVITIN, N. (1982). Enzymatic hydrolysis of cellulose and varios pretreated wood fractions. *Biotechnol. Bioeng.* 24, p. 1389-1402.
- SADDLER, J.N.; HOGAN, C.M. and LOUIS-SEIZE, G. (1985). A comparison between the cellulase systems of *Trichoderma harzianum* E 58 and *Trichoderma reesei* C30. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, p.139-145.
- SAEMAN, J.F.; MILLET, M.A. and LAWTON, E.J. (1952). Effect of high-energy cathode rays on cellulose. *Ind. Eng. Chem.* 44, p. 2848-2852.
- SANGLARD, D.; LEISOLA, M.S.A. and FIECHTER, A. (1986). Role of extra- cellular ligninases in biodegradation of benzo(a) pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 8, p. 209-212.
- SARKANEN, K.V. (1980). Acid-catalyzed delignification of lignocellulosics in organic solvents. In: *Progress in Biomass Conversion*, K. V. Sarkanen and D.D. Tillman (Eds). Academic Press. New York, vol 2, p. 127-144.
- SCHÖLLER. (1961). Sacarificación de la madera. En: *Tecnología Química*, Vol. V, K. Winnacker (Ed), p. 60-83.
- SCHULTZ, T.P.; BIERMANN, C.J. and MCGINNIS, G.D. (1983). Steam-explosion of mixed hardwood chips as a biomass pretreatment. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 22, p. 344-348.

- SMOEMAKER, S.; SCHWESCKART, M.; LADNER, M.B.; GELFAND, D.H.; KWOW, S.; MAYAMBO, K. and INNIS, M. (1983). Molecular cloning of exocellobiohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio/Technology* 1, p. 691-695.
- SOMOGYI, N. (1952). Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, p. 19-23.
- SPANGLER, D.J. and EMERT, G.H. (1986). Simultaneous saccharification/ fermentation with *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 28, p. 115-118.
- SPINDLER, D.D.; WYMAN, C.E.; GROHMANN, K. (1989). Evaluation of thermotolerant yeasts in controlled simultaneous saccharifications and fermentations of cellulose to ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 34, p. 189-195.
- STERNBERG, G.D. and MANDELS, G.R. (1979). Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.* 139, p. 761-769.
- STERNBERG, D.; VIJAYAKUMAR, P. and REESE, E.T. (1977). β -glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Can. J. Microbiol.* 23, p. 139-147.
- SUAREZ, C.; PAZ, M.D. and DIAZ, A. (1983). Efecto de la radiación gamma en la hidrólisis ácida del cardo exento de pentosas. *Report JEN n°548*, 25 pp.
- SUTCLIFFE, R. and SADDLER, J. (1987). The role of lignin in the adsorption of cellulases during enzymatic treatment of lignocellulosic materials. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 17, p. 749-762.
- SZCZODRAK, J. (1988). The enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 32, p. 771-776.
- SZCZODRAK, J. (1989). The use of cellulases from a β -glucosidase- hyperproducing mutant of *Trichoderma reesei* in simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.* 33, p. 1112-1116.
- TANAKA, M.; SONG, G.J.; MATSUNO, R. and KAMIKUDO. (1985a). Optimal conditions for pretreatment of rice straw with n-butylamine for enzymatic solubilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, p. 13-18.
- TANAKA, M.; SONG, G.J.; MATSUNO, R. and KAMIKUDO. (1985b). Evaluation of effectiveness of pretreating rice straw with n-butylamine for improvement of sugar yield. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, p. 19-25.
- TANGNU, S.K. ; BLANCH ,H.W. and WILKE ,C. R. (1981). Enhanced production of cellulase, hemicellulase and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* (Rut-C30). *Biotechnol. Bioeng.* 23, p. 1837-1849.
- TEERI, T.; SALOVOURI, I. and KNOWLES, J. (1983). The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* 1, p. 696-699.
- THOMPSON, D.R. and GRETHELEIN, H.E. (1979). Desing and evaluation of a plung flow reactor for acid hydrolysis of cellulose. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 18, p. 166-169.
- TJERNELD, F.; PERSSON, I.; ALBERTSSON, P. and HAHN-HAGERDAL, B. (1985a). Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. I. Partition of cellulases from *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Bioeng.* 27, p. 1036-1043.
- TJERNELD, F.; PERSSON, I.; ALBERTSSON, P. and HAHN-HAGERDAL, B. (1985b). Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems II. Semicontinuous conversion of a model substrate Solka Floc BW 200. *Biotechnol. Bioeng.* 27, p. 1044-1050.

- TJERNELD, F.; PERSSON, I. and LEE, J.M. (1991). Enzymatic cellulose hydrolysis in an attrition bioreactor combined with an aqueous two-phase system. *Biotechnol. Bioeng.* 37, p. 876-882.
- TORGET, R.; WERDENE, P.; HIMMEL, M. and GROHMANN, K. (1990). Diluted acid pretreatment of short rotation woody and herbaceous crops. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25, p. 115-126.
- TROLLER, J.; SMIT, J.D.G.; LEISOLA, M.S.A.; FALLEN, J.; WINTERHALTER, K.H. and FIECHTER, A. (1988). Crystallization of lignin peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bio/Technology* 6, p.571-573.
- VALLANDER, L. and ERIKSSON, K.E.(1985). Enzymic saccharification of pretreated wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.* 27, p. 650-659.
- VAN ARSDELL, J.N. ; KWOK, S.; SCHWECKART, V.L. ; LADNER , M.B. ; GELFAND, D.H. and INNIS, M.A. (1987). Cloning, characterization and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase I from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* 5, p. 60-64.
- VIIKARI, L.; NYBERGH, P. and LINKO, M. (1981). Hydrolysis of cellulose by *Trichoderma reesei* and simultaneous production of ethanol by *Zymomonas* sp. *Advances in Biotechnology, 11, Fuels, Chemicals, foods and waste treatment* Ed. by M. Moo-Young & C.W. Robison. *Proc. 6th Int. Ferment. Symp. London, Canada. July 20-25.* Pergamon Press. Canada, p. 137-142.
- WALDNER, R.; LEISOLA, M.S.A. and FIECHTER, A. (1988). Comparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29, p. 400-407.
- WASE, D.A.J.; MCMANAMEY, W.J.; RAYMAHASAY, S. and VAID, A.K. (1985). Comparisons between cellulase production by *Aspergillus fumigatus* in agitated vessels and in an air-lift fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 27, p. 1166-1172.
- WASE, D.A.J.; RAYMAHASAY, S. and WANG, C.W. (1985). Production of β -D-glucosidase, endo-1,4- β -D-glucanase and D-xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI 255091. *Enzyme Microb. Technol.* 7, p. 225-229.
- WEI, C.J. and CHENG, C.Y. (1985). Effect of hydrogen peroxide pretreatment on the structural features and the enzymatic hydrolysis of rice straw. *Biotechnol. Bioeng.* 27, p. 1418-1426.
- WILKE, C.R.; YANG, R.D.; SCIAHANA, A.F. and FREITAS, R.P. (1981). Raw materials evaluation and process development studies for conversion of biomass to sugar and ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 23, p. 163-183.
- WILSON, D.B. and WALKER, L.P. (1991). Engineering cellulases. *Bioresource Technology* 36, p. 67-75.
- WINUGROHO, M.; IBRAHIM, M.N.M. and PEARCE, G.R. (1984). A Soak-and-press method for the alkali treatment of fibrous crop residues calcium hydroxide treatments of rice straw. *Agricultural Wastes* 9, p. 87-99.
- WONGKHALAUNG, C.; KASHIWAGI, Y.; MAGAE, Y.; OHTA, T.; and SASAKI, T. (1985). Cellulase immobilized on a soluble polymer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, p. 37-41.
- WOOD, T.M. and McGRAE, S.I. (1972). The purification and properties of the C1 component of *Trichoderma koningii* cellulose. *Biochem. J.* 128, p. 1183-1197.

- WOODWARD, J. (1991). Synergism in cellulase systems. *Bioresource Technology* 36, p. 67-75.
- WOODWARD, J.; KRASNIAK, S.R.; SMITH, R.D.; SPIELBERG, F. and ZACHRY, G.S. (1982). Preparation and characterization of β -D-glucosidase immobilized in calcium alginate. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* n° 12, p. 485-489.
- WRIGHT, J.D. and D'AGINCOURT C.G. (1984). Evaluation of sulphuric acid hydrolysis processes for alcohol fuel production. Informe SERI/TR-231-2074, 99pp.
- WRIGHT, J.D. and WYMAN, C.E. (1987). Overview of acid hydrolysis of lignocellulosics to liquid fuels. In: Biochemical conversion program annual review meeting. Solar Energy Research Institute, October 13-15, p. A1-A19.
- WRIGHT, J.D.; WYMAN, C.E. and GROHMANN, K. (1987). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose process evaluation. Informe SERI/TR-231-3161, 15 pp.
- WYMAN, C.E. (1989). Acid hydrolysis of cellulose in biomass to fermentation sugars. In: Ethanol from biomass annual review meeting. Solar Energy Research Institute, January 17-19, p. A1-A12.
- WYMAN, C.E. (1990). The DOE/SERI ethanol from biomass program. In: Ethanol from biomass annual review meeting (Draft Proceedings). Solar Energy Research Institute, September 12-13, Lincoln, Nebraska.

MEDIOS DE CULTIVO

Medio de patata-glucosa

Composición:

Trozos de patata pelada	300 g
Glucosa20 g
Peptona	1 g
Agar	15 g
H ₂ O1000 ml
pH antes de esterilizar.	6

Preparación:

Los trozos de patata se hierven en aproximadamente 500 ml de H₂O durante 1 hora. A continuación se filtra a través de gasa y se enrasa a 1 litro con agua destilada. Posteriormente se añade el agar y la glucosa, ajustandose el pH a 6 antes de esterilizar.

Medios líquidos de producción de celulasas.

Composición:

COMPONENTES (g/l)	SUSTRATO HIDROCARBONADO(g/l)	
	10	20
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4	3,9
KH ₂ PO ₄	2,0	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,15	0,15
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,34	0,34
NH ₂ CONH ₂	0,3	0,3
Peptona	1,0	1,6
Tween-80 (ml)	0,2	0,2

Preparación:

A este medio, ya preparado, se le añadió una solución de metales traza preparada aparte, en una cantidad de 1 ml. por litro de medio. El medio debe esterilizarse previamente. La solución de metales traza tiene la siguiente composición:

Elementos traza

ClH	5 ml.
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.5 g
MnSO ₄ H ₂ O	1,6 g

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,76 g
CoCl ₂	2 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml.

La disolución de metales trazas, una vez preparada y estéril, se mantiene estable en nevera durante aproximadamente tres meses.

El pH del medio se ajustó después de esterilizar a 5-5,5 mediante la adición de NaOH 2N o ClH 0,5 N.

REACTIVO 3,5-DINITROSALICÍLICO.

Composición:

- ácido 3,5-dinitrosalicílico al 1% (p/v).
- hidróxido sódico al 1% (p/v).
- sulfito sódico al 0,05% (p/v).
- sales de *Rochelle* (tartrato sódico-potásico) al 20% (p/v).
- fenol destilado al 0,2% (p/v).

REACTIVO PROTEINAS.

Composición:

- A) Solución de Na₂CO₃ al 2% (p/v) en NaOH 0,1 N.
- B) Solución de CaSO₄ al 0,5% (p/v) en tartrato potásico al 1% (p/v).
- C) Solución alcalina de cobre que se obtiene mezclando 50 ml de A y 1 ml de C.
- D) Reactivo de Folin diluido 1/1 con agua destilada.

DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES.

Reactivo alcalino de Somogyi.

Composición:

Solución I

- tartrato sódico potásico 12 g.
- carbonato disódico anhidro 24 g.
- carbonato monosódico 16 g
- sulfato sódico 114 g.
- agua destilada 500 ml.

Solución II

- sulfato de cobre CuSO₄·7H₂O 4 g.
- sulfito disódico 36 g.
- agua destilada 200 ml.

Preparación:

El reactivo cúprico se prepara en el momento de su utilización mezclando 4 volúmenes de la solución I y un volumen de la solución II.

Reactivo de Nelson

Composición:

Solución I:

-(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 25 g.

-H₂SO₄ concentrado 21 ml.

-agua destilada 400 ml.

Solución II:

-Na₂HAsO₄·7H₂O 3 g.

-agua destilada 25 ml.

Preparación:

El reactivo arsenomolibdico se prepara mezclando las soluciones I y II en frasco topacio y se deja en oscuridad a 37°C durante 24 horas.

Procedimiento:

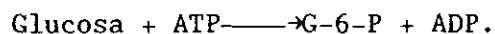
Se toma 1 ml muestra convenientemente diluida para que la concentración de azúcares se encuentre del margen adecuado, se añade 1 ml de reactivo de Somogyi. La mezcla se calienta en baño de agua a ebullición durante 30 minutos. A continuación se enfrían los tubos y se añade 1 ml de reactivo arsenomolibdico. Cuando acaba la reacción se enrasa a 25 ml con agua desionizada y finalmente se determina la DO a 540 nm, frente a un blanco preparado de forma idéntica a la muestra problema en el que ésta última es sustituida por 1 ml de agua desionizada, como patrón se utilizó una disolución de glucosa de 100 µg/ml.

En general, aunque los residuos agrícolas contienen distintos azúcares, cuyas cantidades varían de unos a otros, vamos a referir los datos de azúcares reductores a glucosa, independientemente de las diferencias en el poder reductor de unos azúcares a otros.

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA.

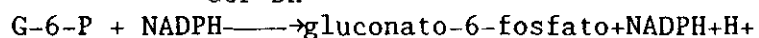
Para la determinación de glucosa se ha utilizado el método enzimático (de la 6 hexoquinasa) comercializado por *Boehringer*. La glucosa se determina a un pH 7,6, con las enzimas hexoquinasa (HK) y glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH). La glucosa se fosforila con adenosin-5'-trifosfato (ATP).

HK



La glucosa-6-fosfato formada es posteriormente oxidada por la nicotinamida-adenin-dinucleótido fosfato (NADP) en presencia de glucosa-6-fosfato- deshidrogenasa (G6P-DH) a glucosa-6-fosfato formandose NADPH reducido.

G6P-DH



La cantidad de NADPH formada durante la reacción es proporcional a la cantidad de glucosa formada. El NADPH se determina por su absorción en espectrofotómetro a 340 nm.

DETERMINACION DE GLUCOSA Y CELOBIOSA POR HPLC

La separación y cuantificación de glucosa y celobiosa se ha llevado a cabo con un cromatógrafo de líquidos *Hewlett-Packard* 1081B con detector de índice de refracción 79877A.

Columna: *Aminex* HPX-87P (300x7,8 mm).

Temperatura de columna: 85°C.

Eluyente: agua reactiva.

Flujo del eluyente: 0,6 ml/min.

DESCRIPCION DE LA PLANTA PILOTO.

La planta piloto en la que se han llevado a cabo las pruebas de explosión por vapor está constituida por 3 unidades: reactor de explosión por vapor, acumulador y ciclón de descarga, cuyas características se describen a continuación.

Reactor de explosión por vapor.

Es la cámara donde la biomasa lignocelulósica es comprimida y despresurizada súbitamente.

Consiste en una tubería de 3" de diametro nominal de acero inoxidable 316, montado verticalmente y limitado por 2 válvulas de paso reducido de 3" de diametro en acero inoxidable 316.

La válvula situada en el extremo superior se abre manualmente y a su través se efectúa la carga de la biomasa lignocelulósica en el reactor.

La válvula del extremo inferior de la cámara se abre mediante un dispositivo de disparador y muelle con el fin de lograr una apertura en menos de 1 segundo. De esta manera, la mezcla de vapor y biomasa se descarga violentamente pasando a través de la tubería que conduce al ciclón.

La cámara del reactor, válvulas y tubería de descarga están aisladas con lana mineral, de 70 mm de espesor, con el fin de disminuir al máximo razonable la condensación del vapor en el proceso de compresión-expansión.

La cámara del reactor está provista de la siguiente instrumentación y elementos de seguridad:

- a) Dos termómetros, uno en la parte superior de la cámara, cerca de la válvula de carga y otro en la parte inferior, cerca de la válvula de descarga, de modo que pueda comprobarse la temperatura del vapor y de la biomasa independientemente.
- b) Válvula de seguridad tarada a la presión máxima del acumulador de vapor.
- c) Un manómetro.
- d) Conexión de ventilación para despresurización después de los precalentamientos con el fin de permitir, a continuación, la apertura de la válvula de carga.

Existen, además, dos entradas de vapor, una en la parte superior de la cámara y otra en la inferior.

Ciclón de descarga

La mezcla de vapor y material lignocelulósico expulsado en cada disparo entra en el ciclón de descarga horizontal y tangencialmente. El ciclón está construido en acero inoxidable 316 y tiene una parte cilíndrica de 16" de diámetro y una parte troncocónica que partiendo de la cilíndrica, hacia abajo y con ángulo de 60° acaba en el cuello de una brida DN-80 y DN 16, sobre la que se monta una válvula de tipo tajadera por la que se extrae el material expandido en el reactor.

El borde superior de la parte cilíndrica del ciclón acaba en una brida de 16" provista de orejetas y pasadores que sujetan las 16 pernas de ojo que fijan la brida ciega, que hace de tapadera de ciclón.

El ciclón incorpora un termómetro y un manómetro.

Acumulador de vapor.

El acumulador ha de suministrar vapor al reactor de explosión por vapor. Consiste en un recipiente a presión provisto de 3 resistencias eléctricas de 9 Kw de potencia cada una.

El recipiente tiene un diámetro de 1000 mm y una altura, entre líneas de tangencia de 930 mm. Está construido con acero al carbono y posee las siguientes conexiones, instrumentos y elementos de seguridad.

- conexión de 1" de diámetro para el indicador de nivel
- drenaje de 3"/4" diámetro
- válvula de seguridad de 2"x3" de diámetro
- manómetro
- termómetro
- presostatos de control de las resistencias eléctricas.

En la salida de vapor además de una placa de orificio limitadora de caudal, se dispone de una derivación de venteo a la atmósfera, cerrada por dos válvulas, con el fin de permitir la salida de aire en los llenados iniciales y en la puesta en temperatura de servicio.

Los presostatos que actúan sobre las resistencias están tarados a presiones escalonadas y actuará uno sobre cada resistencia apagándola o encendiéndola según se alcance o no el nivel de consigna.

ANEXO III
Justificación estadística

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXI.

Ensayo: Tratamiento alcalino con hidróxido sódico. Recuperación glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	71	8233,844		
Temperatura	2	2260,188	1130,094	244,958
Concentración	1	538,875	538,875	116,806
Tiempo	2	3042,375	1521,188	329,731
Temperatura x concentración	2	668,563	334,281	72,458****
temperatura x tiempo	4	1036,031	259,008	56,142***
Concentración x tiempo	2	214,969	107,484	23,298***
Temperatura x concentración x tiempo	4	223,719	55,930	12,123
Error	54	249,125	4,613	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
100°C 120°C	2	54	14,629	107,009****
100°C 150°C	2	54	21,699	235,433****
120°C 150°C	2	54	7,070	24,993****
1% 2%	1	54	10,807	116,800****
10 min 30 min	2	54	22,140	245,082****
10 min 90 min	2	54	22,338	249,490****
30 min 90 min	2	54	0,198	0,020 ^{NS}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXI.

Ensayo: Pretratamiento alcalino con hidróxido sódico. Recuperación lignina (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	71	11080,530		
Temperatura	2	2100,344	1050,172	82,176
Concentración	1	2900,031	2900,031	226,928
Tiempo	2	2120,969	1060,484	82,983
Temperatura x concentración	2	446,313	223,156	17,462**
temperatura x tiempo	4	1390,406	347,602	27,200***
Concentración x tiempo	2	472,281	236,141	18,478***
Temperatura x concentración x tiempo	4	960,094	240,023	18,782
Error	54	690,094	12,780	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION		G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
100°C	120°C	2	54	10,301	53,052 ****
100°C	150°C	2	54	11,760	69,147 ****
120°C	150°C	2	54	1,459	1,065 NS
1%	2%	1	54	15,064	226,929 ****
10 min	30 min	2	54	9,700	47,044 ****
10 min	90 min	2	54	12,192	74,326 ****
30 min	90 min	2	54	2,492	3,106 *

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXI.

Ensayo: Tratamiento alcalino con hidróxido sódico. Eficiencia de sacarificación (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	71	40238,810		
Temperatura	2	11303,360	5651,680	1909,867
Concentración	1	269,688	269,688	91,135
Tiempo	2	7435,032	3717,516	1256,256
Temperatura x concentración	2	278,938	139,469	47,131 ^{***}
temperatura x tiempo	4	17660,830	4415,207	1492,027 ^{****}
Concentración x tiempo	2	1976,203	988,102	333,908 ^{****}
Temperatura x concentración x tiempo	4	1154,969	288,742	97,574
Error	54	159,797	2,959	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
100°C 120°C	2	54	25,314	320,409 ^{****}
100°C 150°C	2	54	61,485	1890,225 ^{****}
120°C 150°C	2	54	36,171	654,169 ^{****}
1% 2%	1	54	9,547	91,140 ^{****}
10 min 30 min	2	54	44,361	983,949 ^{****}
10 min 90 min	2	54	42,391	898,494 ^{****}
30 min 90 min	2	54	1,970	1,941 ^{NS}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tablas XVI, XVII, XVIII y XIX.

Ensayo: Tratamiento alcalino con hidróxido sódico. Producción de glucosa por hidrólisis enzimática (mg/100 mg sustrato).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	71	5071,910		
Temperatura	2	1871,359	935,680	1301,684
Concentración	1	4,230	4,230	5,885
Tiempo	2	297,357	463,679	645,053
Temperatura x concentración	2	94,475	47,237	65,715***
temperatura x tiempo	4	1715,852	428,963	596,758***
Concentración x tiempo	2	86,355	43,178	60,067***
Temperatura x concentración x tiempo	4	333,456	83,366	115,976
Error	54	38,816	0,719	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
100°C 120°C	2	54	15,567	121,166***
100°C 150°C	2	54	49,864	1243,214***
120°C 150°C	2	54	34,297	588,145***
1% 2%	1	54	2,424	5,877*
10 min 30 min	2	54	30,596	468,058***
10 min 90 min	2	54	31,592	499,025***
30 min 90 min	2	54	0,996	0,496 ^{NS}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XVI, XVII, XVIII y XIX.

Ensayo: Tratamiento alcalino con hidróxido sódico. Conversión de celulosa en glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	71	18354,010		
Temperatura	2	6967,875	3483,938	2062,964
Concentración	1	277,523	277,523	164,332
Tiempo	2	6258,688	3129,344	1852,996
Temperatura x concentración	2	190,508	95,254	56,403***
temperatura x tiempo	4	3821,188	955,297	565,665****
Concentración x tiempo	2	464,063	232,031	137,394****
Temperatura x concentración x tiempo	4	282,969	70,742	41,888***
Error	54	91,195	1,689	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
100°C 120°C	2	54	33,715	568,343****
100°C 150°C	2	54	64,206	2061,227****
120°C 150°C	2	54	30,492	464,868****
1% 2%	1	54	12,819	164,317****
10 min 30 min	2	54	52,682	1387,691****
10 min 90 min	2	54	52,760	1391,790****
30 min 90 min	2	54	0,078	0,003 ^{NS}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXXV.

Ensayo: Pretratamiento de irradiación. Recuperación de glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	47	3725,266		
Dosis	2	1715,828	857,914	97,213 ^{****}
Medio	3	286,469	95,490	10,820 ^{****}
Dosis X Medio	6	1405,266	234,211	26,539
Error	36	317,703	8,825	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
20 Mrad 50 Mrad	2	36	2,076	2,155 ^{NS}
20 Mrad 100 Mrad	2	36	12,979	84,227 ^{****}
50 Mrad 100 Mrad	2	36	10,903	59,436 ^{****}
HCl H ₂ SO ₄	3	36	2,885	2,775 [*]
HCl CH ₃ -COOH	3	36	2,765	2,548 [*]
HCl H ₂ O	3	36	0,552	0,102 ^{NS}
H ₂ SO ₄ CH ₃ -COOH	3	36	5,650	10,642 ^{****}
H ₂ SO ₄ H ₂ O	3	36	3,438	3,939 ^{**}
CH ₃ -COOH H ₂ O	3	36	2,213	1,632 ^{NS}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXI.

Ensayo: Tratamiento alcalino con hidróxido sódico. Recuperación azúcares reductores (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	71	5870,907		
Temperatura	2	1813,813	906,906	182,959
Concentración	1	31,406	31,406	6,336
Tiempo	2	2014,719	1007,359	203,224
Temperatura x concentración	2	367,219	183,609	37,041 ^{***}
temperatura x tiempo	4	303,313	75,828	15,298 ^{**}
Concentración x tiempo	2	705,781	352,891	71,192 ^{****}
Temperatura x concentración x tiempo	4	366,984	91,746	18,509
Error	54	267,672	4,957	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
100°C 120°C	2	54	13,048	85,121 ^{****}
100°C 150°C	2	54	18,638	173,686 ^{****}
120°C 150°C	2	54	5,590	15,626 ^{****}
1% 2%	1	54	2,516	6,332 ^{**}
10 min 30 min	2	54	16,080	129,290 ^{****}
10 min 90 min	2	54	18,571	172,444 ^{****}
30 min 90 min	2	54	2,491	3,102 [*]

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXXVI.

Ensayo: Pretratamiento combinado irradiación y posterior tratamiento ácido.
Recuperación glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	71	7205,422		
Dosis	2	4120,922	2060,461	323,415
Medio	1	1168,031	1168,031	183,337
Acido	2	423,203	211,602	33,214
Dosis \times medio	2	125,422	62,711	9,843**
Dosis \times ácido	4	461,547	115,387	18,111***
Medio \times ácido	2	180,281	90,141	14,149**
Dosis \times medio \times ácido	4	381,984	95,496	14,989
Error	54	344,031	6,371	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
20 Mrad 50 Mrad	2	54	21,241	225,581****
20 Mrad 100 Mrad	2	54	22,734	258,422****
50 Mrad 100 Mrad	2	54	1,494	1,116 ^{NS}
Agua Aire	1	54	13,540	183,329****
HCl SO ₄ H ₂	2	54	5,616	15,767****
HCl CH ₃ -COOH	2	54	7,923	31,386****
SO ₄ H ₂ CH ₃ -COOH	2	54	2,307	2,662*

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXXV:

Ensayo: Pretratamiento de irradiación. Recuperación de azúcares reductores (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	47	572,891		
Dosis	2	80,477	40,238	32,387****
Medio	3	50,680	16,893	13,597****
Dosis X Medio	6	397,008	66,168	53,258
Error	36	44,727	1,242	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
20 Mrad 50 Mrad	2	36	4,728	11,176****
20 Mrad 100 Mrad	2	36	8,004	32,035****
50 Mrad 100 Mrad	2	36	3,277	5,368***
HCl H2SO4	3	36	6,269	13,098****
HCl CH3-COOH	3	36	3,805	4,827***
HCl H2O	3	36	2,584	2,226 ^{NS}
H2SO4 CH3-COOH	3	36	2,463	2,022 ^{NS}
H2SO4 H2O	3	36	3,685	4,525***
CH3-COOH H2O	3	36	1,221	0,497 ^{NS}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXXVI.

Ensayo: Pretratamiento combinado irradiación y posterior tratamiento ácido.
Recuperación de azúcares reductores (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	71	12216,080		
Dosis	2	4189,844	2094,922	729,623
Medio	1	1164,750	1164,75	405,661
Acido	2	5922,688	2961,344	1031,382
Dosis medio	2	42,563	21,281	7,412 ^{**}
Dosis ácido	4	398,734	99,684	34,718 ^{***}
Medio ácido	2	181,906	90,953	31,677 ^{***}
Dosis medio x ácido	4	160,547	40,137	13,979
Error	54	155,047	2,871	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
20 Mrad 50 Mrad	2	54	34,076	580,586 ^{****}
20 Mrad 100 Mrad	2	54	31,990	511,676 ^{****}
50 Mrad 100 Mrad	2	54	2,086	2,176 ^{NS}
Agua Aire	1	54	20,141	405,663 ^{****}
HCl SO4H2	2	54	1,451	1,053 ^{NS}
HCl CH3-COOH	2	54	40,039	801,547 ^{****}
SO4H2 CH3-COOH	2	54	38,587	744,485 ^{****}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXXV.

Ensayo: Pretratamiento de irradiación. Recuperación de lignina (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	47	7656,157		
Dosis	2	1,500	0,750	0,015 ^{NS}
Medio	3	4407,188	1469,063	29,706 ^{****}
Dosis X Medio	6	1467,125	244,521	4,944
Error	36	1780,344	49,454	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
20 Mrad 50 Mrad	2	36	0,106	0,006 ^{NS}
20 Mrad 100 Mrad	2	36	0,168	0,014 ^{NS}
50 Mrad 100 Mrad	2	36	0,062	0,002 ^{NS}
HCl H2SO4	3	36	1,174	0,459 ^{NS}
HCl CH3-COOH	3	36	3,723	4,620 ^{***}
HCl H2O	3	36	5,630	10,564 ^{****}
H2SO4 CH3-COOH	3	36	4,896	7,992 ^{****}
H2SO4 H2O	3	36	4,456	6,619 ^{***}
CH3-COOH H2O	3	36	9,353	29,157 ^{****}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXXVI.

Ensayo: Pretratamiento combinado irradiación y posterior tratamiento ácido.
Recuperación lignina (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	71	9824,469		
Dosis	2	2031,625	1015,813	82,896
Medio	1	1831,281	1831,281	149,443
Acido	2	1742,719	871,359	71,108
Dosis \times medio	2	852,406	426,203	34,781 ^{***}
Dosis \times ácido	4	610,469	152,617	12,454 ^{**}
Medio \times ácido	2	1230,719	615,359	50,217 ^{***}
Dosis \times medio \times ácido	4	863,531	215,883	17,617
Error	54	661,719	12,254	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
20 Mrad 50 Mrad	2	54	11,987	71,841 ^{****}
20 Mrad 100 Mrad	2	54	10,066	50,663 ^{****}
50 Mrad 100 Mrad	2	54	1,921	1,844 ^{NS}
Agua Aire	1	54	12,225	149,447 ^{****}
HCl S04H2	2	54	0,580	0,168 ^{NS}
HCl CH3-COOH	2	54	10,606	56,242 ^{****}
S04H2 CH3-COOH	2	54	10,026	50,257 ^{****}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXXVII.

Ensayo: Pretratamiento de irradiación. Producción de glucosa por hidrólisis enzimática (mg /100 mg sustrato).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	47	298,188		
Dosis	2	73,639	36,819	79,028****
Medio	3	124,455	41,485	89,042****
Dosis X Medio	6	83,322	13,877	29,807
Error	36	16,722	0,466	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
20 Mrad 50 Mrad	2	36	11,649	67,852****
20 Mrad 100 Mrad	2	36	9,919	49,195****
50 Mrad 100 Mrad	2	36	1,730	1,497 ^{NS}
HCl H2SO4	3	36	2,377	1,884 ^{NS}
HCl CH3-COOH	3	36	3,690	4,539***
HCl H2O	3	36	11,938	47,507****
H2SO4 CH3-COOH	3	36	6,068	12,273****
H2SO4 H2O	3	36	9,561	30,469****
CH3-COOH H2O	3	36	15,628	81,416****

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXXVIII.

Ensayo: Pretratamiento combinado irradiación y posterior tratamiento ácido. Producción de glucosa por hidrólisis enzimática (mg/100 mg sustrato).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	71	766,201		
Dosis	2	81,615	40,808	31,307
Medio	1	45,744	45,744	35,094
Acido	2	275,816	137,908	105,802
Dosis medio	2	64,422	32,211	24,712 ^{***}
Dosis ácido	4	116,596	29,149	22,363 ^{***}
Medio ácido	2	41,797	20,898	16,033 ^{**}
Dosis medio x ácido	4	69,824	17,456	13,392
Error	54	70,387	1,303	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
20 Mrad 50 Mrad	2	54	6,620	21,909 ^{****}
20 Mrad 100 Mrad	2	54	0,445	0,099 ^{NS}
50 Mrad 100 Mrad	2	54	7,065	24,954 ^{****}
Agua Aire	1	54	5,924	35,095 ^{****}
HCl SO4H2	2	54	3,836	7,356 ^{***}
HCl CH3-COOH	2	54	14,070	98,979 ^{****}
SO4H2 CH3-COOH	2	54	10,234	52,368 ^{****}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXXVII.

Ensayo: Pretratamiento de irradiación. Eficacia de sacarificación (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	47	3316,383		
Dosis	2	618,625	309,313	74,440****
Medio	3	1595,703	531,901	128,01****
Dosis X Medio	6	952,469	158,745	38,204
Error	36	149,586	4,155	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
20 Mrad 50 Mrad	2	36	9,588	45,965****
20 Mrad 100 Mrad	2	36	11,329	64,178****
50 Mrad 100 Mrad	2	36	1,741	1,516 ^{NS}
HCl H2SO4	3	36	0,127	0,005 ^{NS}
HCl CH3-COOH	3	36	2,183	1,589 ^{NS}
HCl H2O	3	36	16,645	92,352****
H2SO4 CH3-COOH	3	36	2,056	1,409 ^{NS}
H2SO4 H2O	3	36	16,518	90,946****
CH3-COOH H2O	3	36	14,462	69,716****

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXXVIII.

Ensayo: Pretratamiento combinado irradiación y posterior tratamiento ácido.
Eficiencia de sacarificación (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	71	2392,047		
Dosis	2	350,547	175,273	25,295
Medio	1	49,891	49,891	7,200
Acido	2	195,328	97,664	14,095
Dosis medio	2	319,141	159,570	23,029 ^{***}
Dosis ácido	4	531,734	132,934	19,185 ^{***}
Medio ácido	2	244,422	122,211	17,637 ^{***}
Dosis medio x ácido	4	326,813	81,703	11,791
Error	54	374,172	6,929	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
20 Mrad 50 Mrad	2	54	6,747	22,758 ^{****}
20 Mrad 100 Mrad	2	54	1,422	1,012 ^{NS}
50 Mrad 100 Mrad	2	54	5,324	14,174 ^{****}
Agua Aire	1	54	2,683	7,199 ^{***}
HCl SO ₄ H ₂	2	54	2,163	2,338 ^{NS}
HCl CH ₃ -COOH	2	54	3,118	4,862 ^{**}
SO ₄ H ₂ CH ₃ -COOH	2	54	5,281	13,944 ^{****}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXXVII.

Ensayo: Pretratamiento de irradiación. Conversión de celulosa en glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	47	1107,332		
Dosis	2	168,932	84,466	50,769****
Medio	3	507,125	169,042	101,604****
Dosis X Medio	6	371,381	61,897	37,203
Error	36	59,895	1,664	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
20 Mrad 50 Mrad	2	36	8,093	32,747****
20 Mrad 100 Mrad	2	36	1,153	0,664 ^{NS}
50 Mrad 100 Mrad	2	36	9,245	42,739****
HCl H2SO4	3	36	4,133	5,639***
HCl CH3-COOH	3	36	0,941	0,080 ^{NS}
HCl H2O	3	36	15,309	78,126****
H2SO4 CH3-COOH	3	36	3,622	4,374***
H2SO4 H2O	3	36	11,196	41,786****
CH3-COOH H2O	3	36	14,819	73,199****

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXXVIII.

Ensayo: Pretratamiento combinado irradiación y posterior tratamiento ácido. Conversión de celulosa en glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	71	1507,188		
Dosis	2	407,895	203,947	84,541
Medio	1	281,602	281,602	116,731
Acido	2	181,742	90,871	37,668
Dosis \times medio	2	77,824	38,912	16,130 ^{**}
Dosis \times ácido	4	272,535	68,134	28,243 ^{***}
Medio \times ácido	2	21,578	10,789	4,472 [*]
Dosis medio \times ácido	4	133,742	33,436	13,860
Error	54	130,270	2,412	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
20 Mrad 50 Mrad	2	54	7,142	25,502 ^{****}
20 Mrad 100 Mrad	2	54	12,981	84,258 ^{****}
50 Mrad 100 Mrad	2	54	5,840	17,051 ^{****}
Agua Aire	1	54	10,804	116,729 ^{****}
HCl S04H2	2	54	0,258	0,033 ^{NS}
HCl CH3-COOH	2	54	7,643	29,204 ^{****}
S04H2 CH3-COOH	2	54	7,384	27,263 ^{****}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XXXIX.

Ensayo: Pretratamiento con etanol. Composición en glucosa (%)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	7	665,626	95,089	68,205****
Error	24	33,460	1,394	

Ensayo: Pretratamiento con etanol. Composición en azúcares reductores (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	7	561,172	80,167	17,638****
Error	24	109,086	4,545	

Ensayo: Pretratamiento con etanol. Composición en lignina (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	7	424,634	60,662	39,594****
Error	24	36,771	1,532	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XL.

Ensayo: Pretratamiento con butanol. Composición en glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	5	980,762	196,153	200,869****
Error	18	17,577	0,977	

Ensayo: Pretratamiento con butanol. Composición en azúcares reductores (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	5	348,576	69,715	13,346****
Error	18	94,025	5,244	

Ensayo: Pretratamiento con butanol. composición en lignina (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	5	382,325	76,465	133,298****
Error	18	10,326	0,574	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XLI.

Ensayo: Pretratamiento con etanol. Recuperación de glucosa (%)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	7	1093,807	156,258	25,862****
Error	24	145,006	6,042	

Ensayo: Pretratamiento con etanol. Recuperación de azúcares reductores.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	7	4346,815	620,974	79,327****
Error	24	187,873	7,828	

Ensayo: Pretratamiento con etanol. Recuperación de lignina (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	7	1422,705	203,244	10,844****
Error	24	449,826	18,743	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XLII.

Ensayo: Pretratamiento con butanol. Recuperación de glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	5	1137,326	227,465	50,890****
Error	18	80,455	4,470	

Ensayo: Pretratamiento con butanol. Recuperación de azúcares reductores (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	5	3822,018	764,404	76,481****
Error	18	179,904	9,995	

Ensayo: Pretratamiento con butanol. Recuperación de lignina (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	5	4809,834	961,967	90,778****
Error	18	190,745	10,597	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla XLIV.

Ensayo: Pretratamiento con etanol. Producción de glucosa (mg/100 mg sustrato) por hidrólisis enzimática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	7	1409,374	201,339	359,306****
Error	24	13,449	0,560	

Ensayo: Pretratamiento con etanol. Producción de azúcares reductores (mg/100 mg sustrato) por hidrólisis enzimática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	7	2881,458	411,637	479,559****
Error	24	20,601	0,858	

Ensayo: Pretratamiento con etanol. Eficacia de sacarificación (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	7	4614,864	659,266	164,662****
Error	24	96,090	4,004	

Ensayo: Pretratamiento con etanol. Conversión de celulosa en glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	7	4090,927	584,418	172,274****
Error	24	81,417	3,392	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo.

REFERENCIA EN EL TEXTO: TABLA XLV.

Ensayo: Pretratamiento con butanol. Producción de glucosa (mg/100 mg sustrato) por hidrólisis enzimática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	5	1232,686	246,537	588,462 ^{****}
Error	18	7,541	0,419	

Ensayo: Pretratamiento con butanol. Producción de azúcares reductores (mg/100 mg sustrato) por hidrólisis enzimática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	5	2393,897	478,779	769,349 ^{****}
Error	18	11,202	0,622	

Ensayo: Pretratamiento con butanol. Eficiencia de sacarificación (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	5	2742,622	548,524	181,843 ^{****}
Error	18	54,296	3,016	

Ensayo: Pretratamiento con butanol. Conversión de celulosa en glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	5	2778,854	555,771	145,235 ^{****}
Error	18	68,880	3,827	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LI.

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor. Recuperación de glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	39	1057,125		
Temperatura	1	357,484	357,484	44,185 ^{****}
Tiempo	4	187,750	46,938	5,801 ^{***}
TemperaturaxTiempo	4	269,172	67,293	8,317 ^{****}
Error	30	242,719	8,091	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
210°C 230°C	1	30	6,647	44,185 ^{****}
30 s 1 min	4	30	3,445	2,968 ^{**}
30 s 2 min	4	30	3,572	3,190 ^{**}
30 s 4 min	4	30	3,160	2,496 [*]
30 s 8 min	4	30	0,646	0,104 ^{NS}
1 min 2 min	4	30	0,127	0,004 ^{NS}
1 min 4 min	4	30	0,286	0,020 ^{NS}
1 min 8 min	4	30	2,799	1,959 ^{NS}
2 min 4 min	4	30	0,412	0,042 ^{NS}
2 min 8 min	4	30	2,926	2,140 ^{NS}
4 min 8 min	4	30	2,514	1,580 ^{NS}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LI.

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor. Recuperación de glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	47	1038,563		
Temperatura	2	249,031	124,516	19,774****
Tiempo	3	233,750	77,917	12,374****
TemperaturaxTiempo	6	329,094	54,849	8,711****
Error	36	226,688	6,297	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION		G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
190°C	210°C	2	36	2,935	4,307**
190°C	230°C	2	36	3,350	5,610***
210°C	230°C	2	36	6,285	19,748****
30 s	1 min	3	36	4,477	6,682***
30 s	2 min	3	36	4,109	5,627***
30 s	4 min	3	36	5,739	10,978****
1 min	2 min	3	36	0,368	0,045 ^{NS}
1 min	4 min	3	36	1,262	0,531 ^{NS}
2 min	4 min	3	36	1,630	0,886 ^{NS}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LI.

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor. Recuperación azúcares reductores (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	39	1359,484		
Temperatura	1	410,695	410,695	72,111 ^{****}
Tiempo	4	649,953	162,488	28,530 ^{****}
TemperaturaxTiempo	4	127,977	31,994	5,618 ^{***}
Error	30	170,859	5,695	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION		G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
210°C	230°C	1	30	8,492	72,110 ^{****}
30 s	1 min	4	30	8,863	19,640 ^{****}
30 s	2 min	4	30	8,844	19,552 ^{****}
30 s	4 min	4	30	8,419	17,721 ^{****}
30 s	8 min	4	30	6,282	9,867 ^{***}
1 min	2 min	4	30	0,020	0,000 ^{NS}
1 min	4 min	4	30	0,444	0,049 ^{NS}
1 min	8 min	4	30	2,581	1,666 ^{NS}
2 min	4 min	4	30	0,424	0,045 ^{NS}
2 min	8 min	4	30	2,561	1,640 ^{NS}
4 min	8 min	4	30	2,137	1,142 ^{NS}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LI.

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor. Recuperación azúcares reductores (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	47	2655,313		
Temperatura	2	1498,422	749,211	137,205****
Tiempo	3	472,406	157,469	28,838****
Temperatura x Tiempo	6	487,906	81,318	14,892****
Error	36	196,578	5,461	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION		G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
190°C	210°C	2	36	8,056	32,499****
190°C	230°C	2	36	16,564	137,176****
210°C	230°C	2	36	8,508	36,190****
30 s	1 min	3	36	5,234	9,132****
30 s	2 min	3	36	8,208	22,455****
30 s	4 min	3	36	7,891	20,758****
1 min	2 min	3	36	2,974	2,974**
1 min	4 min	3	36	2,657	2,354*
2 min	4 min	3	36	0,316	0,033 ^{NS}

* $P < 0,10$

** $P < 0,05$

*** $P < 0,01$

**** $P < 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LI.

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor. Recuperación de lignina (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	39	6027,875		
Temperatura	1	1022,844	1022,844	49,438****
Tiempo	4	2932,375	733,094	35,433****
TemperaturaxTiempo	4	1451,969	362,992	17,545****
Error	30	602,688	20,690	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION		G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
210°C	230°C	1	30	7,031	49,442****
30 s	1 min	4	30	7,649	14,627****
30 s	2 min	4	30	9,211	21,209****
30 s	4 min	4	30	8,033	16,133****
30 s	8 min	4	30	1,492	0,557 ^{NS}
1 min	2 min	4	30	1,561	0,610 ^{NS}
1 min	4 min	4	30	0,384	0,037 ^{NS}
1 min	8 min	4	30	6,,157	9,477****
2 min	4 min	4	30	1,177	0,347 ^{NS}
2 min	8 min	4	30	7,718	14,893****
4 min	8 min	4	30	6,541	10,696****

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LI.

Ensayo: pretratamiento de explosión por vapor. Recuperación de lignina (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	47	11784,660		
Temperatura	2	3743,156	1871,578	99,725****
Tiempo	3	5108,188	1702,729	90,728****
TemperaturaxTiempo	6	2257,688	376,281	20,050****
Error	36	675,625	18,767	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
190°C 210°C	2	36	4,119	8,485****
190°C 230°C	2	36	13,759	94,649****
210°C 230°C	2	36	9,639	46,457****
30 s 1 min	3	36	15,468	79,754****
30 s 2 min	3	36	12,607	52,975****
30 s 4 min	3	36	10,278	35,212****
1 min 2 min	3	36	2,862	2,729**
1 min 4 min	3	36	5,190	8,979****
2 min 4 min	3	36	2,329	1,807 ^{NS}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LII.

Ensayo: Pretratamiento de explosión de vapor. Producción de glucosa por hidrólisis enzimática (mg glucosa/100 mg sustrato).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	39	732,828		
Temperatura	1	148,723	148,723	152,069 ^{****}
Tiempo	4	373,246	93,312	95,411 ^{****}
TemperaturaxTiempo	4	181,520	45,380	46,401 ^{****}
Error	30	29,340	0,978	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION		G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
210°C	230°C	1	30	12,332	152,072 ^{****}
30 s	1 min	4	30	12,005	36,032 ^{****}
30 s	2 min	4	30	11,184	31,269 ^{****}
30 s	4 min	4	30	17,084	72,966 ^{****}
30 s	8 min	4	30	16,705	69,763 ^{****}
1 min	2 min	4	30	0,822	0,169 ^{NS}
1 min	4 min	4	30	5,079	6,448 ^{****}
1 min	8 min	4	30	4,699	5,521 ^{***}
2 min	4 min	4	30	5,900	8,703 ^{****}
2 min	8 min	4	30	5,521	7,621 ^{****}
4 min	8 min	4	30	0,379	0,036 ^{NS}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LII.

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor. Producción de glucosa (mg/100 mg sustrato) por hidrólisis enzimática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	47	1703,711		
Temperatura	2	1094,699	547,356	473,739****
Tiempo	3	297,219	99,073	85,749****
Temperatura x Tiempo	6	270,199	45,033	38,977****
Error	36	41,594	1,155	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION		G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
190°C	210°C	2	36	15,722	123,598****
190°C	230°C	2	36	30,779	473,668****
210°C	230°C	2	36	15,056	113,056****
30 s	1 min	3	36	3,671	4,492***
30 s	2 min	3	36	8,559	24,418****
30 s	4 min	3	36	15,137	76,378****
1 min	2 min	3	36	4,888	7,965****
1 min	4 min	3	36	11,466	43,826****
2 min	4 min	3	36	6,578	14,424****

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LII.

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor. Eficiencia de sacarificación (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	39	5436,407		
Temperatura	1	1781,719	1781,719	198,566 ^{****}
Tiempo	4	1950,781	487,695	54,352 ^{****}
TemperaturaxTiempo	4	1434,719	358,680	39,974 ^{****}
Error	30	269,188	8,973	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION		G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
210°C	230°C	1	30	14,091	198,563 ^{****}
30 s	1 min	4	30	11,671	34,053 ^{****}
30 s	2 min	4	30	10,099	25,046 ^{****}
30 s	4 min	4	30	13,383	44,779 ^{****}
30 s	8 min	4	30	7,932	15,729 ^{****}
1 min	2 min	4	30	1,662	0,690 ^{NS}
1 min	4 min	4	30	1,713	0,733 ^{NS}
1 min	8 min	4	30	3,739	3,495 ^{**}
2 min	4 min	4	30	3,374	2,846 [*]
2 min	8 min	4	30	2,077	1,079 ^{NS}
4 min	8 min	4	30	5,452	7,430 ^{****}

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LII.

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor. Eficiencia de sacarificación (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	47	11273,160		
Temperatura	2	7158,000	3579,000	352,033****
Tiempo	3	2261,531	753,844	74,149****
TemperaturaxTiempo	6	1487,625	247,938	24,387****
Error	36	366,000	10,167	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION		G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
190°C	210°C	2	36	10,819	58,524****
190°C	230°C	2	36	26,392	348,265****
210°C	230°C	2	36	15,573	121,259****
30 s	1 min	3	36	7,878	20,688***
30 s	2 min	3	36	9,007	27,041****
30 s	4 min	3	36	14,798	72,999****
1 min	2 min	3	36	1,129	0,425 ^{NS}
1 min	4 min	3	36	6,920	15,964****
2 min	4 min	3	36	5,792	11,181****

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LII.

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor. Conversión de celulosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	47	4452,938		
Temperatura	2	3173,250	1586,625	403,620****
Tiempo	3	659,734	219,911	55,943****
TemperaturaxTiempo	6	478,438	79,740	20,285****
Error	36	141,516	3,931	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION		G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
190°C	210°C	2	36	16,022	128,356****
190°C	230°C	2	36	28,331	401,319****
210°C	230°C	2	36	12,309	75,751****
30 s	1 min	3	36	4,967	8,222****
30 s	2 min	3	36	6,115	12,466****
30 s	4 min	3	36	12,844	54,985****
1 min	2 min	3	36	1,149	0,440 ^{NS}
1 min	4 min	3	36	7,877	20,682****
2 min	4 min	3	36	6,728	15,089****

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LII.

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor. (Conversión de celulosa en glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Total	39	1641,219		
Temperatura	1	253,938	253,938	80,099****
Tiempo	4	559,969	139,992	44,157****
TemperaturaxTiempo	4	732,203	183,051	57,739****
Error	30	95,109	3,170	

TEST DE SCHEFFE. COMPARACION MULTIPLE.

COMPARACION	G.L. numerador	G.L. denominador	Q	F
210°C 230°C	1	30	8,949	80,091****
30 s 1 min	4	30	9,399	22,085****
30 s 2 min	4	30	7,194	12,940****
30 s 4 min	4	30	12,489	38,995****
30 s 8 min	4	30	9,416	22,164****
1 min 2 min	4	30	2,204	1,215 ^{NS}
1 min 4 min	4	30	3,090	2,388*
1 min 8 min	4	30	0,017	0,000 ^{NS}
2 min 4 min	4	30	5,295	7,009****
2 min 8 min	4	30	2,221	1,233 ^{NS}
4 min 8 min	4	30	3,074	2,362*

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LIV.

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor en medio ácido. Recuperación de glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	10	1264,207	126,421	8,879****
Error	33	469,855	14,238	

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor en medio ácido. Recuperación de azúcares reductores (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	10	1293,557	129,356	17,998****
Error	33	237,178	7,187	

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor en medio ácido. Recuperación de lignina (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	10	1046,619	104,662	4,546****
Error	33	759,313	23,021	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LV.

Ensayo: Pretratamiento de explosión de vapor en medio ácido. Producción de glucosa (mg/100 mg sustrato) por hidrólisis enzimática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	10	266,520	26,651	33,416****
Error	33	26,320	0,789	

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor en medio ácido. Producción de azúcares reductores (mg/100 mg sustrato) por hidrólisis enzimática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	10	1611,244	161,124	28,167****
Error	33	188,771	5,720	

Ensayo: Pretratamiento de explosión por vapor en medio ácido. Eficacia de sacarificación (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	10	1171,248	117,125	23,861****
Error	33	161,986	4,909	

Ensayo: Pretratamiento de explosión de vapor en medio ácido. Conversión de celulosa en glucosa (%).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	10	299,903	29,990	50,841****
Error	33	19,466	0,590	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tablas LVI, LVII, LVIII y LIX.

Ensayo: Variación de la recuperación de material inicial (%) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento alcalino.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	3	2485,029	828,343	229,025****
Error	4	14,465	3,617	

Ensayo: Variación de la recuperación de material inicial (%) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a tratamiento oxidante.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	3	2,730	0,910	9,811**
Error	4	0,371	0,093	

Ensayo: Variación de la recuperación de material inicial (%) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento ácido.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	3	301,080	100,369	24,899***
Error	4	16,123	4,031	

Ensayo: Variación de la recuperación de material inicial (%) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* nativo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	3	704,318	234,773	10,013**
Error	4	93,789	23,447	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tablas LVI, LVII, LVIII y LIX.

Ensayo: Variación del porcentaje glucosa en la composición a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento alcalino.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	503,910	125,977	119,164****
Error	15	15,858	1,057	

Ensayo: Variación del porcentaje glucosa en la composición a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento oxidante.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	5,371	1,343	1,055 NS
Error	15	19,086	1,272	

Ensayo: Variación del porcentaje glucosa en la composición a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento ácido.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	217,936	54,484	23,417****
Error	15	34,900	2,327	

Ensayo: Variación del porcentaje glucosa en la composición a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O. nervosum* nativo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	756,735	189,184	298,052****
Error	15	9,521	0,635	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tablas LVI, LVII, LVIII y LIX.

Ensayo: Variación del porcentaje de azúcares reductores en la composición a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento alcalino.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	1668,906	417,226	105,975****
Error	15	59,055	3,937	

Ensayo: Variación del porcentaje de azúcares reductores en la composición a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento oxidante.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	1401,605	350,401	27,739***
Error	15	189,481	12,632	

Ensayo: Variación del porcentaje de azúcares reductores en la composición a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento ácido.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	197,121	49,280	3,261*
Error	15	226,699	15,113	

Ensayo: Variación del porcentaje de azúcares reductores en la composición a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O. nervosum* nativo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	2245,140	561,285	214,433****
Error	15	39,263	2,618	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tablas LVI, LVII, LVIII y LIX.

Ensayo: Variación del porcentaje de lignina en la composición a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento alcalino.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	27,880	6,970	5,090 ***
Error	15	20,541	1,369	

Ensayo: Variación del porcentaje de lignina en la composición a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento oxidante.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	24,418	6,104	8,641 ****
Error	15	10,596	0,706	

Ensayo: Variación del porcentaje de lignina en la composición a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento ácido.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	79,191	19,798	20,949 ****
Error	15	14,176	0,945	

Ensayo: Variación del porcentaje de lignina en la composición a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* nativo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	634,866	158,717	99,033 ****
Error	15	24,040	1,603	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LX.

Ensayo: Variación de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática (mg glucosa/100 mg sustrato) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento alcalino.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	1040,632	260,158	456,224****
Error	15	8,554	0,570	

Ensayo: Variación de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática (mg/ 100 mg sustrato) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento oxidante.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	50,570	12,,642	39,805****
Error	15	4,764	0,318	

Ensayo: Variación de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática (mg glucosa/ 100 mg sustrato) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento ácido.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	131,161	32,794	609,604****
Error	15	0,807	0,054	

Ensayo: Variación de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática (mg glucosa/ 100 mg sustrato) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O. nervosum* nativo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	64,926	16,2322	428,312****
Error	15	0,568	0,038	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LXI.

Ensayo: Variación de la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática (mg glucosa/100 mg sustrato) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento alcalino.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	2151,766	537,941	591,495****
Error	15	13,642	0,909	

Ensayo: Variación de la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática (mg/100 mg sustrato) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento oxidante.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	98,723	24,681	19,142****
Error	15	19,340	1,289	

Ensayo: Variación de la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática (mg glucosa/ 100 mg sustrato) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento ácido.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	168,198	42,050	200,264****
Error	15	3,150	0,210	

Ensayo: Variación de la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática (mg glucosa/ 100 mg sustrato) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O. nervosum* nativo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	156,750	39,188	512,217****
Error	15	1,148	0,077	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LXII.

Ensayo: Eficacia de sacarificación (% ES) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento alcalino.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	4759,520	1189,880	443,302****
Error	15	40,262	2,684	

Ensayo: Eficacia de sacarificación (% ES) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento ácido.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	473,107	118,277	320,289****
Error	15	5,539	0,369	

Ensayo: Eficacia de sacarificación (% ES) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento oxidante.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	184,836	46,209	20,866****
Error	15	33,219	2,215	

Ensayo: Eficacia de sacarificación (% ES) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O. nervosum* nativo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	160,713	40,178	66,375****
Error	15	9,080	0,605	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

REFERENCIA EN EL TEXTO: Tabla LXIII.

Ensayo: Conversión de celulosa en glucosa (% CC) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento alcalino.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	7290,828	1822,707	994,402****
Error	15	27,481	1,832	

Ensayo: Conversión de celulosa en glucosa (% CC) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento ácido.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	4373,412	1093,353	437,225****
Error	15	37,510	2,501	

Ensayo: Conversión de celulosa en glucosa (% CC) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* sometido a pretratamiento oxidante.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	497,416	124,354	812,617****
Error	15	2,295	0,153	

Ensayo: Conversión de celulosa en glucosa (% CC) a lo largo de la fermentación con *P.chrysosporium* sobre *O.nervosum* nativo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Tratamientos	4	866,568	216,642	758,736****
Error	15	4,283	0,286	

* $P \leq 0,10$

** $P \leq 0,05$

*** $P \leq 0,01$

**** $P \leq 0,001$

NS no significativo

	INDICE DE FIGURAS	página
1	Comparación de la composición de maderas duras y maderas blandas	4
2	Representación de la estructura primaria de la celulosa	9
3	Estructura de la celulosa	11
4	a-Estructura del O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano.Hemicelulosas de tejidos de angiospermas b-Estructura del O-acetil-4-O-galactoglucomanano.Hemicelulosas de tejidos de gimnospermas	12
5	Estructura de la lignina	13
6	Esquema de la arquitectura de la pared celular característica de las fibras vegetales	15
7	Distribución aproximada de los constituyentes químicos en las distintas capas de la pared celular	16
8	Organización de la celulosa de la fibra	17
9	Procesos de transformación de materiales lignocelulósicos	21
10	Esquema de las etapas secuenciales en la hidrólisis enzimática de la celulosa	28
11	Genealogía de los mutantes hiperproductores de celulasas	34
12	Procesos de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica	47
13	<i>Onopordum nervosum</i> Boiss	60
14	Procedimiento realizado para el estudio de la composición de la biomasa lignocelulósica	62
15	Esquema del diagrama de operación de la planta piloto de tratamiento de material lignocelulósico	68
16	Cinética de producción de celulasas por <i>T. longibrachiatum</i> QM9414 sobre 1% de Solka Floc HW200. Volumen total 9 litros.Evolución de (●) pH ,(○) actividad sobre papel de filtro,(✱) actividad β-glucosidasa, (★) actividad endoglucanasa, (✱) proteínas extracelulares a lo largo de 7 días	74
17	Cinética de producción de celulasas por <i>T. longibrachiatum</i> QM9414 sobre 2% de Solka Floc HW200 Volumen total 9 litros.Evolución de (●) pH ,(○) actividad sobre papel de filtro,(✱) actividad β-glucosidasa, (★) actividad endoglucanasa, (✱) proteínas extracelulares a lo largo de 11 días	75
18	Cinética de producción de celulasas por <i>T. longibrachiatum</i> QM9414 sobre 2% de <i>O. nervosum</i> sometido a pretratamiento ácido. Volumen total 2,5 litros.Evolución de (●) pH (○) actividad sobre papel de filtro, (✱) actividad β-glucosidasa, (✱) proteínas extracelulares a lo largo de 12 días	77

		página
19	Efecto del pH en la hidrólisis enzimática del Solka Floc HW200 a distintas temperaturas, expresado como azúcares reductores liberados: (●) 30°C, (x) 35°C, (○) 40°C, (□) 45°C, (Δ) 50°C y (■) 55°C Tiempo de hidrólisis : 4 horas Relación sólido-líquido (p/v): 5%	80
20	Efecto del pH en la hidrólisis enzimática del Solka Floc HW200 a distintas temperaturas, expresado como glucosa liberada: (●) 30°C, (x) 35°C, (○) 40°C, (□) 45°C, (Δ) 50°C y (■) 55°C Tiempo de hidrólisis : 4 horas Relación sólido-líquido (p/v): 5%	81
21	Efecto del pH en la hidrólisis enzimática del Solka Floc HW200 a distintas temperaturas, expresado como relación entre glucosa y azúcares reductores liberados: (●) 30°C, (x) 35°C, (○) 40°C, (□) 45°C, (Δ) 50°C y (■) 55°C Tiempo de hidrólisis : 4 horas Relación sólido-líquido (p/v): 5%	82
22	Efecto del pH en la hidrólisis enzimática del Solka Floc HW200 a distintas temperaturas en la recuperación de enzimas, expresado como porcentaje del valor inicial de proteínas en el medio de hidrólisis: (●) 30°C, (x) 35°C, (○) 40°C, (□) 45°C, (Δ) 50°C y (■) 55°C Tiempo de hidrólisis : 4 horas Relación sólido-líquido (p/v): 5%	84
23	Efecto de la proporción de enzima (expresada como gramos de proteínas por 100 g de sustrato) en la producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de Solka Floc 2HW200 Relación sólido-líquido (p/v) : 5% (A) y 10% (B)	86
24	Efecto de la proporción de enzima (expresada como gramos de proteínas por 100 g de sustrato) en la producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de <i>O. nervosum</i> nativo Relación sólido-líquido (p/v) : 5% (A) y 10% (B)	87
25	Efecto de la proporción de enzima (expresada como gramos de proteínas por 100 g de sustrato) en la producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de <i>O. nervosum</i> pretratado con H ₂ O ₂ en medio básico Relación sólido-líquido (p/v) : 5% (A) y 10% (B)	88
26	Efecto de la proporción de enzima (expresada como gramos de proteínas por 100 g de sustrato) en la producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de <i>O. nervosum</i> pretratado con NaOH Relación sólido-líquido (p/v) : 5% (A) y 10% (B)	89
27	Eficacia del complejo celulolítico (mg azúcares reductores/UIPF) (—→ y —) en función de la relación E/S (UIPF/g celulosa inicial) Tiempo de hidrólisis : 48 horas Sustrato: (A) Solka Floc HW 200 y (B) <i>O. nervosum</i> nativo	90

		página
28	Eficacia del complejo celulolítico (mg azúcares reductores/UIPF) (← →) y rendimiento de la hidrólisis (mg azúcares reductores/100 mg celulosa) (—) en función de la relación E/S (UIPF/g celulosa inicial) Tiempo de hidrólisis : 48 horas Sustrato: (A) <i>O. nervosum</i> pretratado con H ₂ O ₂ y (B) <i>O. nervosum</i> pretratado con NaOH	91
29	Variación de las actividades enzimáticas : (○) β-Glucosidasa y (●) sobre papel de filtro, en función del tiempo de incubación a 50°C, del complejo enzimático producido por <i>Trichoderma longibrachiatum</i> QM9414	94
30	Efecto de la adición de : (A) glucosa, (B) celobiosa y (C) etanol, en la producción de azúcares por hidrólisis enzimática del <i>O. nervosum</i>	96
31	Diferentes estrategias para estudiar el comportamiento hidrolítico del complejo enzimático	97
32	Producción de glucosa por hidrólisis enzimática. Sustratos: (A) Solka Floc HW200, (B) <i>O. nervosum</i> pretratado y (C) <i>O. nervosum</i> sin tratar	98
33	Producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática. Sustratos: (A) Solka Floc HW200, (B) <i>O. nervosum</i> pretratado y (C) <i>O. nervosum</i> sin tratar	99
34	Efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad β-Glucosidasa utilizando pNPG como sustrato. Representación de Lineweaver-Burk (●) sin glucosa, (○) 0,5 mM, (▲) 0,75 mM y (Δ) 1 mM	101
35	Efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad β-Glucosidasa utilizando celobiosa como sustrato. Representación de Lineweaver-Burk (●) sin glucosa, (○) 1 mM, (▲) 2,5 mM y (Δ) 5 mM	102
36	Influencia de la dosis de irradiación gamma en la solubilización del sustrato <i>O. nervosum</i> en diferentes medios	143
37	Influencia de la dosis de irradiación gamma en la solubilización del sustrato <i>O. nervosum</i> con diferentes ácidos.	144
38	Planta piloto de tratamiento de materiales lignocelulósicos	174
39	Influencia del tiempo de fermentación con <i>P. chrysosporium</i> en la pérdida de peso seco de <i>O. nervosum</i> nativo o sometido a diferentes pretratamientos.	190
40	Influencia del tiempo de fermentación con <i>P. chrysosporium</i> en el contenido de nitrógeno total de <i>O. nervosum</i> nativo o sometido a diferentes pretratamientos.	191
41	Influencia del tiempo de fermentación con <i>P. chrysosporium</i> en la recuperación de celulosa referida a la composición inicial de sustrato <i>O. nervosum</i> nativo o sometido a diferentes pretratamientos.	197
42	Influencia del tiempo de fermentación con <i>P. chrysosporium</i> en la recuperación de azúcares reductores referida a la composición inicial de sustrato <i>O. nervosum</i> nativo o sometido a diferentes pretratamientos.	198
43	Influencia del tiempo de fermentación con <i>P. chrysosporium</i> en la recuperación de lignina referida a la composición inicial de sustrato <i>O. nervosum</i> nativo o sometido a diferentes pretratamientos.	199

		página
44	Efecto del tipo de pretratamiento de la biomasa de <i>O. nervosum</i> en el porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) y en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina.	208
45	Efecto del tipo de pretratamiento de la biomasa de <i>O. nervosum</i> en la producción de glucosa y azúcares reductores (mg/100 mg sustrato pretratado) por hidrólisis enzimática.	209
46	Influencia del tipo de pretratamiento de la biomasa de <i>O. nervosum</i> en la eficacia de sacarificación (ES) y conversión de celulosa en glucosa (CC) por hidrólisis enzimática	210
47	Cinética de hidrólisis del <i>O. nervosum</i> pretratado con diferentes concentraciones de enzima	213
48	Efecto de la dosis de enzima en el rendimiento de la hidrólisis del <i>O. nervosum</i> pretratado después de 24 y 48 horas	214

	INDICE DE TABLAS	página
I	Rendimientos y producción en residuos agrícolas de algunos cultivos	3
II	Composición media de algunos residuos agrícolas lignocelulósicos	5
III	Datos de producción de residuos forestales en España	6
IV	Celobiohidrolasas de hongos	24
V	β -Glucosidasas de hongos	25
VI	Endoglucanasas de hongos	26
VII	Microorganismos productores de celulasas	32
VIII	Mecanismos bioquímicos del control de la síntesis de celulasas de <i>T.reesei</i>	33
IX	Actividades enzimáticas obtenidas en cultivos de diferentes cepas de microorganismos celulolíticos	35
X	Métodos utilizados para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos	39
XI	Características de la producción de enzimas	75
XII	Influencia del tipo de sustrato en la producción de celulasas por <i>T.longibrachiatum</i> QM9414	76
XIII	Parámetros cinéticos de la β -Glucosidasa de <i>T.longibrachiatum</i> QM9414	103
XIV	Composición química de la biomasa del cardo <i>O. nervosum</i>	108
XV	Influencia del grado de molienda en la producción de glucosa y azúcares reductores por hidrólisis enzimática	109
XVI	Efecto del pretratamiento alcalino con hidróxido sódico a 25° C sobre: porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y el rendimiento en la hidrólisis enzimática	112
XVII	Efecto del pretratamiento alcalino con hidróxido sódico a 100° C sobre: porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y el rendimiento en la hidrólisis enzimática	113
XVIII	Efecto del pretratamiento alcalino con hidróxido sódico a 120° C sobre: porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y el rendimiento en la hidrólisis enzimática	114
XIX	Efecto del pretratamiento alcalino con hidróxido sódico a 150° C sobre: porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y el rendimiento en la hidrólisis enzimática	115
XX	Porcentaje de recuperación del material inicial (expresado como peso seco) (r) y composición de los residuos sólidos obtenidos para las distintas condiciones de pretratamiento alcalino con hidróxido sódico ensayadas	117
XXI	Efecto del pretratamiento alcalino con hidróxido sódico en la recuperación de glucosa azúcares reductores y lignina. Efecto en el rendimiento de la hidrólisis enzimática expresado como porcentaje de eficiencia de sacarificación	118

		página
XXII	Rendimiento de diversos pretratamientos alcalinos con hidróxido sódico de diferentes sustratos lignocelulósicos	122
XXIII	Efecto del pretratamiento alcalino con hidróxido cálcico en la recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r), glucosa, azúcares reductores y lignina y efecto sobre rendimiento de la hidrólisis enzimática.	124
XXIV	Efecto del pretratamiento oxidante en medio alcalino en la eficacia de sacarificación de distintos materiales lignocelulósicos	127
XXV	<i>Porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y composición de los residuos sólidos obtenidos para las distintas condiciones de pretratamiento oxidante con hipoclorito sódico</i>	129
XXVI	Efecto del pretratamiento oxidante con hipoclorito sódico en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina.	130
XXVII	<i>Efecto del pretratamiento oxidante con hipoclorito sódico en el rendimiento de la hidrólisis enzimática.</i>	131
XXVIII	Efecto del pretratamiento con ácido clorhídrico a 25° C sobre: porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y el rendimiento en la hidrólisis enzimática	135
XXIX	Efecto del pretratamiento con ácido clorhídrico a 70° C sobre: porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y el rendimiento en la hidrólisis enzimática	136
XXX	Efecto del pretratamiento con ácido clorhídrico a 100 ° C sobre: porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y el rendimiento en la hidrólisis enzimática	137
XXXI	Efecto del pretratamiento con ácido sulfúrico a 100°C sobre: porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y el rendimiento en la hidrólisis enzimática	138
XXXII	Efecto del pretratamiento ácido acético sobre: porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y el rendimiento en la hidrólisis enzimática	139
XXXIII	Porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y composición de los residuos sólidos obtenidos para las distintas condiciones de pretratamiento con irradiación ensayadas	146
XXXIV	<i>Porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y composición de los residuos sólidos obtenidos para las distintas condiciones de pretratamiento combinado de irradiación y posterior tratamiento ácido.</i>	147
XXXV	Efecto del pretratamiento con irradiación en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina.	148
XXXVI	Efecto del pretratamiento combinado irradiación y posterior tratamiento ácido en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina.	149
XXXVII	Efecto del pretratamiento por irradiación en el rendimiento de la hidrólisis enzimática.	151

	página
XXXVIII	Efecto del pretratamiento combinado irradiación y posterior tratamiento ácido en el rendimiento de la hidrólisis enzimática. 152
XXXIX	Porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y composición de los residuos sólidos obtenidos para las distintas condiciones de pretratamiento con etanol 158
XL	Porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y composición de los residuos sólidos obtenidos para las distintas condiciones de pretratamiento con butanol 159
XLI	Efecto del pretratamiento con etanol en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina. 161
XLII	Efecto del pretratamiento con butanol en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina. 162
XLIII	Recuperación de material inicial y deslignificación (%) para distintos sustratos lignocelulósicos 163
XLIV	Efecto del pretratamiento con etanol en el rendimiento de la hidrólisis enzimática. 165
XLV	Efecto del pretratamiento con butanol en el rendimiento de la hidrólisis enzimática. 166
XLVI	Rendimientos de hidrólisis de diversos pretratamientos con solventes orgánicos de diferentes sustratos lignocelulósicos 167
XLVII	Porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y composición de los residuos sólidos obtenidos para las distintas condiciones de pretratamiento con n-butilamina 169
XLVIII	Efecto del pretratamiento con n-butilamina en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina. 170
XLIX	Efecto del pretratamiento con n-butilamina en el rendimiento de la hidrólisis enzimática. 172
L	Porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y composición de los residuos sólidos obtenidos para las distintas condiciones de pretratamiento de explosión por vapor 177
LI	Efecto del pretratamiento de explosión por vapor en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina. 178
LII	Efecto del pretratamiento de explosión por vapor en el rendimiento de la hidrólisis enzimática. 180
LIII	Porcentaje de recuperación de material inicial (expresado como peso seco) (r) y composición de los residuos sólidos obtenidos para las distintas condiciones de pretratamiento con explosión de vapor en medio ácido 183
LIV	Efecto del pretratamiento con explosión de vapor en medio ácido en la recuperación de glucosa, azúcares reductores y lignina. 185
LV	Efecto del pretratamiento con explosión de vapor en medio ácido en el rendimiento de la hidrólisis enzimática. 186

		página
LVI	Recuperación de material inicial (expresado como porcentaje en peso seco) (r) y composición de los residuos resultantes de la fermentación con <i>P. chrysosporium</i> sobre <i>O. nervosum</i> nativo	193
LVII	Recuperación de material inicial (expresado como porcentaje en peso seco) (r) y composición de los residuos resultantes de la fermentación con <i>P. chrysosporium</i> sobre <i>O. nervosum</i> sometido a pretratamiento ácido	194
LVIII	Recuperación de material inicial (expresado como porcentaje en peso seco) (r) y composición de los residuos resultantes de la fermentación con <i>P. chrysosporium</i> sobre <i>O. nervosum</i> sometido a pretratamiento alcalino	195
LIX	Recuperación de material inicial (expresado como porcentaje en peso seco) (r) y composición de los residuos resultantes de la fermentación con <i>P. chrysosporium</i> sobre <i>O. nervosum</i> sometido a pretratamiento oxidante	196
LX	Producción de glucosa por hidrólisis enzimática (mg/100 mg sustrato) de los residuos resultantes de la fermentación por <i>P. chrysosporium</i> sobre <i>O. nervosum</i> nativo o sometido a diferentes pretratamientos	201
LXI	Producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática (mg/100 mg sustrato) de los residuos resultantes de la fermentación por <i>P. chrysosporium</i> sobre <i>O. nervosum</i> nativo o sometido a diferentes pretratamientos	202
LXII	Valores de eficacia de sacarificación (%) de los residuos resultantes de la fermentación por <i>P. chrysosporium</i> sobre <i>O. nervosum</i> nativo o sometido a diferentes pretratamientos	203
LXIII	Valores de conversión de celulosa en glucosa (%) de los residuos resultantes de la fermentación por <i>P. chrysosporium</i> sobre <i>O. nervosum</i> nativo o sometido a diferentes pretratamientos	204
LXIV	Condiciones de operación de los pretratamientos seleccionados como más efectivos para la biomasa de <i>O. nervosum</i> .	207